

Identifizierung, Charakterisierung und Regulation
des LOXL4-Gens
in Plattenepithelkarzinomzellen und –Biopsaten
des oberen Aerodigestivtraktes

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Claudia Holtmeier

Kiel

2003

Referent: Prof. Dr. T.C.G. Bosch

Korreferent: Prof. Dr. H. Kalthoff

Tag der mündlichen Prüfung: 03.11.2003

Zum Druck genehmigt: 03.11.2003

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes	1
1.2 Molekulargenetik von HNSCCs	3
1.2.1 Tumorsuppressorgene in HNSCCs	4
1.2.2 Onkogene in HNSCCs	5
1.3 Herkömmliche Therapie von HNSCCs und ihre Problematik	7
1.4 Molekularbiologische Ansätze zur Therapie von HNSCCs und ihre Problematik	9
1.5 Die Rolle der Lysyl-Oxidasen	12
1.6 Zielsetzungen	15
2 Material	17
3 Methoden	17
3.1 Zellkulturen und Gewebebiopsate	17
3.1.1 Kultivierung von Plattenepithelkarzinomzelllinien	18
3.1.2 Präparation und Kultivierung gesunder Epithelzellen	19
3.1.3 Tumorbiopsate	20
3.2 RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellkulturen und Biopsaten	20
3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	21
3.4 Analyse der RNA-Qualität durch Elektrophorese	22
3.5 Reverse Transkription der mRNA	22
3.6 Northern Hybridisierung	23
3.6.1 RNA-Gelelektrophorese	23
3.6.2 Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA-Sonden	24
3.6.3 Northern Hybridisierung	24
3.6.4 Detektion der Hybridisierungssignale	25
3.6.5 Rehybridisierung eines Northern Blots	25
3.7 Nuclear-Run-On	26
3.7.1 Gewinnung nativer Zellkerne aus adhärenenten Zellkulturen	26

3.7.2	Vorbereitung der Probenmembran	27
3.7.3	Run-On-Reaktion	27
3.7.4	Hybridisierung nach der Run-On-Reaktion	28
3.8	Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)	28
3.8.1	Reverse Transkription und Amplifikation mit Hilfe von Zufallsprimern	28
3.8.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Autoradiographie	29
3.8.3	Isolierung differentiell exprimierter Genfragmente	30
3.8.4	Reamplifikation differentiell exprimierter Genfragmente	30
3.9	Klonierung von PCR-Produkten	31
3.9.1	Klonierungsreaktion	31
3.9.2	Plasmidisolierung aus Bakterienklonen	32
3.9.3	Überprüfung der DNA-Inserts durch Restriktionsverdau	33
3.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	33
3.10.1	Cycle-Sequencing	33
3.10.2	Ethanol-fällung von DNA-Proben	34
3.11	Datenbankanalyse	35
3.12	5`RACE-PCR	35
3.13	Isolierung genomischer DNA	37
3.14	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	38
3.15	PCR (Polymerase Chain Reaction)	38
3.16	Isolierung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel	39
3.17	Analyse der regulatorischen Region des LOXL4-Gens	39
3.17.1	Nachweis potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren	39
3.17.2	Herstellung von Reportergenkonstrukten	40
3.17.3	Transiente Transfektion mit Reportergenkonstrukten	41
3.17.4	Dual-Luciferase-Assay	42
3.17.5	Berechnung vergleichbarer DLA-Meßwerte	43
3.17.6	Herstellung von Reportergenkonstrukten mit zusammenhängenden Promotorabschnitten	44
3.18	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	44
3.18.1	Isolierung von Zellkernproteinen	45

3.18.2	Markierung der Oligonucleotide mit [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP	45
3.18.3	EMSA	46
3.18.4	Kompetitionstests	46
3.18.5	Elektrophorese und Autoradiographie	46
3.19	Klassische Chromosomenanalyse	47
3.19.1	Chromosomenpräparation	47
3.19.2	Darstellung der Chromosomenbanden	48
3.19.3	Auswertung der Chromosomenpräparate	48
3.20	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)	49
3.20.1	Herstellung der Sonden für die FISH	49
3.20.2	Aufreinigung von Oligonucleotiden mit SEPHADEX-G50-Säulen	50
3.20.3	Vorbereitung der Chromosomenpräparation für die FISH	51
3.20.4	FISH	52
4	Ergebnisse	53
4.1	DDRT-PCR	53
4.2	Homologieanalyse des differentiell exprimierten Fragmentes	54
4.3	Northern Hybridisierung	55
4.4	5'RACE-PCR	56
4.5	Identifizierung des 5'RACE-PCR-Produktes	57
4.6	Vergleichende Analyse der LOXL4-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes	58
4.7	Statistische Auswertung der Northern-Blot-Ergebnisse	60
4.8	Nuclear-Run-On	61
4.9	Exon/Intron-Organisation des LOXL4-Gens	63
4.9.1	Aufklärung der Exon/Intron-Organisation	63
4.9.2	Vergleichende Analyse der Exonsequenzen des LOXL4-Gens	65
4.10	Bestimmung des Signalpeptids des LOXL4-Enzyms	66
4.11	Analyse der regulatorischen Region des LOXL4-Gens	68
4.11.1	Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des LOXL4-Gens	68
4.11.2	Nachweis potentieller Bindungsstellen für	69

	Transkriptionsfaktoren	
4.11.3	Analyse einzelner Promotorfragmente des LOXL4-Gens mit Hilfe von Reportergenkonstrukten	71
4.11.4	Analyse zusammenhängender Promotorfragmente des LOXL4-Gens mit Hilfe von Reportergenkonstrukten	75
4.12	DLA-Analysen am LOXL4-Promotor in Assoziation mit EMSA Untersuchungen	75
4.13	Cytogenetische Analysen	85
4.13.1	Klassische Chromosomenanalyse	85
4.13.2	FISH	87
5	Diskussion	91
5.1	Zelllinien als Ausgangsmaterial für Laborversuche	91
5.2	DDRT-PCR	92
5.3	Nachweis der Spezifität der differentiellen Expression des gefundenen Genfragmentes mittels Northern Hybridisierung	94
5.4	Analyse der LOXL4-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes	95
5.5	Nuclear-Run-On	97
5.6	Exon/Intron-Organisation	98
5.7	Vergleichende Analyse der 5'-flankierenden Region des LOXL4-Gens	99
5.8	Entwicklung eines Modells für die Regulation des LOXL4-Gens	100
5.8.1	Diskussion der DLA-Ergebnisse in Assoziation zu den EMSA-Ergebnissen	101
5.9	Cytogenetische Analysen	107
5.10	Die Rolle der Lysyl-Oxidasen bei der Karzinogenese	108
5.11	Die Rolle des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes	109
6	Zusammenfassung: Identifizierung, Charakterisierung und Regulation des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomzellen und -Biopsaten des oberen Aerodigestivtraktes	112

7	Summary: Identification, characterization and regulation of the LOXL4-gene in squamous cell carcinoma cells and biopsies of the upper aerodigestive tract	114
8	Literaturverzeichnis	116
9	Anhang	126
10	Lebenslauf	141
11	Erklärung und Publikationsliste	142
12	Danksagung	144

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Seite
Abb. 1.1	Lokalisation der häufigsten Plattenepithelkarzinome im oberen Aerodigestivtrakt. 1
Abb. 1.2	Gesunde (a) und maligne (b) Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes. 2
Abb. 1.3	Stadien der Karzinogenese von HNSCCs. 3
Abb. 1.4	Onkogene in HNSCCs. 7
Abb. 1.5	Prinzip der somatischen Gentherapie. 10
Abb. 1.6	Molekulares Modell für die Karzinogenese von HNSCCs in Anlehnung an CALIFANO <i>et al.</i> (1996). 11
Abb. 3.1	TA-Klonierung. 32
Abb. 3.2	5' RACE-PCR. 36
Abb. 3.3	Karte und Multiple-Cloning-Site des pGL3-Enhancer-Vektors (Promega). 41
Abb. 3.4	Karte des pRL-TK-Vektors (Promega). 42
Abb. 4.1	DDRT-PCR 53
Abb. 4.2	cDNA-Sequenz des FIS-Clone (Acc. No. AK025542). 54
Abb. 4.3	Nachweis der differentiellen Genexpression durch Northern Hybridisierung. 55
Abb. 4.4	Verlängerung der FIS-Clone-Sequenz (Acc. No. AK025542) durch 5' RACE-PCR. 56
Abb. 4.5	Durch 5' RACE-PCR verlängerte FIS-Clone-cDNA-Sequenz. 57
Abb. 4.6	Rekonstruierte LOXL4-cDNA-Sequenz. 58
Abb. 4.7	Nachweis der LOXL4-mRNA mittels Northern Hybridisierung. 59
Abb. 4.8	Statistische Auswertung der Northern-Blot-Analysen. 61
Abb. 4.9	Nuclear-Run-On-Analyse. 62
Abb. 4.10	Exon/Intron-Organisation des LOXL4-Gens. 64
Abb. 4.11	Punktmutationen in Exon 5 (Position 4317) und Exon 10 (Position 9723) des LOXL4-Gens. 65
Abb. 4.12	Aminosäure-Sequenz von LOXL4. 66

Abb. 4.13	Signalpeptid des LOXL4-Gens.	67
Abb. 4.14	Ausschnitt der 5' flankierenden Sequenz des LOXL4-Gens (Pos. -968 - +41).	69
Abb. 4.15	Anordnung einzelner LOXL4-Promotorabschnitte (REPs) inklusive Targetsequenzen für Transkriptionsfaktoren.	72
Abb. 4.16	Vergleichende Untersuchung einzelner LOXL4-Promotorabschnitte in Reportergenkonstrukten.	73
Abb. 4.17	Vergleichende Untersuchung zusammenhängender LOXL4-Promotorabschnitte in Reportergenkonstrukten.	75
Abb. 4.18	DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 1, REP 2 und REP 1-2.	77
Abb. 4.19	DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 3 und REP 1-3.	78
Abb. 4.20	DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 4 und REP 1-4.	79
Abb. 4.21	DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 5 und REP 1-5.	80
Abb. 4.22	DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 6 und REP 1-6.	81
Abb. 4.23	DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 7 und REP 1-7.	82
Abb. 4.24	DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 8, REP 9 und REP 1-9.	83
Abb. 4.25	Karyogramm einer gesunden Epithelzelle aus der Nasenschleimhaut.	85
Abb. 4.26	Karyogramm einer Plattenepithelkarzinomzelle der Zelllinie UTSCC-19A.	86
Abb. 4.27	Schematische Darstellung und Fotografie eines normalen (a) und eines Isochromosoms 10 (b) in der Metaphase	87
Abb. 4.28	Nachweis des LOXL4-Gens auf Interphasechromosomen maligner UT-SCC-19A-Zellen durch FISH.	88
Abb. 4.29	Nachweis des LOXL4-Gens auf Metaphasechromosomen maligner UT-SCC-19A-Zellen durch FISH.	89
Abb. 5.1	Hypothetisches Modell für die Wirkung verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Transkription des LOXL4-Gens.	106

Tabelle		Seite
Tabelle 4.1	Exon/Intronorganisation des LOXL4-Gens.	64
Tabelle 4.2	Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im LOXL4-Promotor.	70
Tabelle 4.3	LOXL4- Promotorabschnitte, die mittels Reportergenkonstrukten untersucht wurden.	71

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession Number
add	Addition
AP-1	activator protein-1
APS	Ammonium-Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
5'-CDS	5'-RACE-cDNA-Synthesis-Primer
cm	Centimeter
CSPD	disodium 3-(4-methoxyspiro 1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclodecan-4-yl)phenyl phosphate
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDRT-PCR	Differential-Display-Reverse-Polymerase-Chain-Reaction
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
der	Derivativ
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
d.h.	das heisst
DIG	Digoxigenin
DLA	Dual-Luciferase-Assay
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat

D-Primer	Downstream-Primer
ds	double-stranded (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EMSA	Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay
FCS	fetal calf serum (Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblastenwachstumsfaktor)
FIS	full insert
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
g	Gramm
G	Guanin
G1-Phase	Gap-1-Phase des Zellzyklus
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GSP	Genspezifischer Primer
HEPES	4-(2-Hydroxymethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereichs)
HPV	Humanes Papilloma-Virus
i	Isochromosom
IFR	Interferon-Rezeptor-Faktor
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
ISCN	International System of Human Cytogenetic Nomenclature
J	Joule
kb	Kilobasen

kDa	Kilo-Dalton
MMLV-RT	<i>Moloney-murine-leukemia-virus</i> reverse transcriptase (Reverse Transkriptase aus dem <i>Moloney murine leukemia virus</i>)
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LO	Lysyl-Oxidase
LOH	loss of heterozygosity
LOX	erste Isoform der Lysyl-Oxidase
LOXL	lysyl-oxidase like (Isoformen der Lysyl-Oxidase)
M	molar (mol/L)
mA	Milliampere
mar	Markerchromosom
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/L)
mm	Millimeter
MOPS	4- Morpholinpropansulfonsäure 3- Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
myc	myc avian myelocytomatosis viral oncogene homologue
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μJ	Mikrojoule
μl	Mikroliter
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nucleotid
Oligo-dT	Oligo-desoxythymidin
<i>p</i>	propability (Wahrscheinlichkeit)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphatpuffer)

PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	potentia hydrogenii
pM	Picomolar (Picomol/Liter)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
RACE	rapid amplification of cDNA-ends
ras	rat sarcoma viral oncogene homologue
RLU	Relative Lightunits
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	rotations per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SRCR	scavenger receptor cystein rich domain
ss	single-strand (Einzelstrang)
SSC	Sodium-Sodium-Citrat-Puffer
std	Stunden
t	Translokation
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-binding protein
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TES	2-[(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethansulfonsäure N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TF	Transkriptionsfaktor
TNM	tumor, nodus, metastases (Klassifizierung für

	Tumore)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSR	Template Suppression Reagent
U	unit
UPM	universal primer-mix
U-Primer	Upstream-Primer
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
W	Watt
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes repräsentieren über 90% aller Karzinome der Kopf-Hals-Region, sowie 6% aller humaner Malignome insgesamt (HOFFMANN *et al.*, 1998). Ihre Genese ist auf die Entartung epithelialer Schleimhautzellen zurückzuführen, von der der Kehlkopf, die Speicheldrüsen, sowie die Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen am häufigsten betroffen sind (BATSAKIS, 1974).

Die Ursache dieser Entartung ist hauptsächlich in der starken Exposition des Gewebes gegenüber diversen endogenen und exogenen Noxen begründet. Dazu zählen neben Alkohol- und Tabakabusus der Einfluß von Strahlungen (Alpha-, Beta-, Gamma-, UV- und Röntgenstrahlen), anorganischen Chemikalien (z.B. Arsen, Asbest, Nickel und Chrom) und organischen Chemikalien (z.B. polyzyklische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine und Nitrosamine) (SCHIRRMACHER, 1986). Nur zu einem geringen Prozentsatz werden Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich (**HNSCC** = engl.: head and neck squamous cell carcinoma) durch genetische Prädisposition (LUND *et al.*, 1990) oder onkogene Viren (SISK *et al.*, 2002) hervorgerufen.

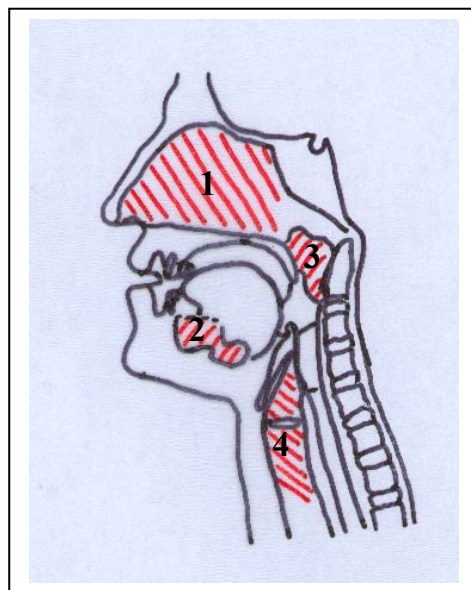


Abb. 1.1: Lokalisation der häufigsten Plattenepithelkarzinome im oberen Aerodigestivtrakt. Gezeigt ist die schematische Darstellung der Kopf-Hals-Region im Sagittalschnitt in Anlehnung an WESTHOFEN *et al.* (2001). Die häufigsten Loci von Plattenepithelkarzinomen dieser Region sind rot schraffiert. Dies sind: 1) Nasen- und Nasennebenhöhle; 2, 3) Speicheldrüsen; 4) Kehlkopf.

Durch die Einwirkung der genannten Risikofaktoren kommt es zu Mutationen in der DNA der epithelialen Schleimhautzellen, wodurch die Karzinogenese ausgelöst werden kann. Nach der **Mehr-Stufen-Hypothese** ist bereits der erste Schritt zur Tumorentstehung erfolgt, sobald die DNA-Schädigung irreversibel ist. Dieses Stadium bezeichnet man als **Initiation**. In der anschließenden Phase, der **Promotion**, werden dann die Mutationen in den primär veränderten Zellen auf die nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben. Da sich die genetischen Veränderungen vor allem in einem unkontrollierten, übermäßig schnellen Wachstum der Karzinomzellen äußern, wird der Tumor in der darauf folgenden **Progression** auch makroskopisch sichtbar (BLEICH *et al.*, 1995). Auf mikroskopischer Ebene lässt sich zudem feststellen, dass die Karzinomzellen nur wenig bis mäßig differenziert sind, vergrößerte, hyperchromatische Zellkerne besitzen und ihr Zellhabitus in Form und Größe stark variiert (ROBBINS, 1988).

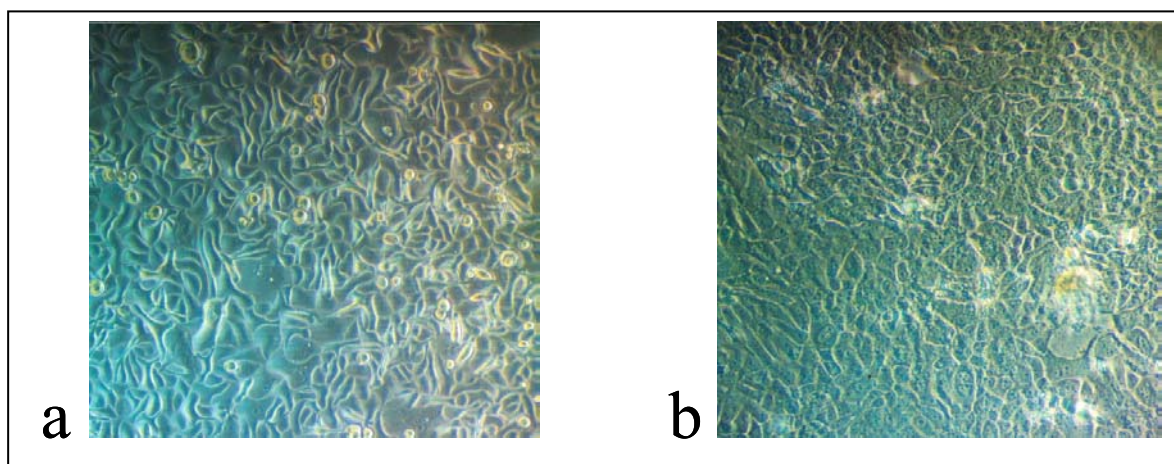


Abb. 1.2: Gesunde (a) und maligne (b) Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes.

Das Gefährliche an HNSCC-Zellen ist wie auch bei Karzinomzellen anderer Tumorentitäten ihre Fähigkeit zur **Metastasierung**. Dabei durchbrechen sie zunächst infolge des Verlustes ihrer Kontaktinhibition die Basalmembran und wandern in das umgebene Gewebe ein. Desweiteren sind sie in der Lage, Lymphgefäße zu penetrieren, über die sie in die regionalen Lymphknoten gelangen, sich dort absiedeln und weiter proliferieren (lymphonoduläre Metastasierung). Anschließend können die Karzinomzellen innerhalb des Lymphgefäßsystems weiterverschleppt werden, wodurch sie in entfernte Körperregionen gelangen und dort Metastasen ausbilden können (lymphogene Metastasierung) (BLEICH *et al.*, 1995).

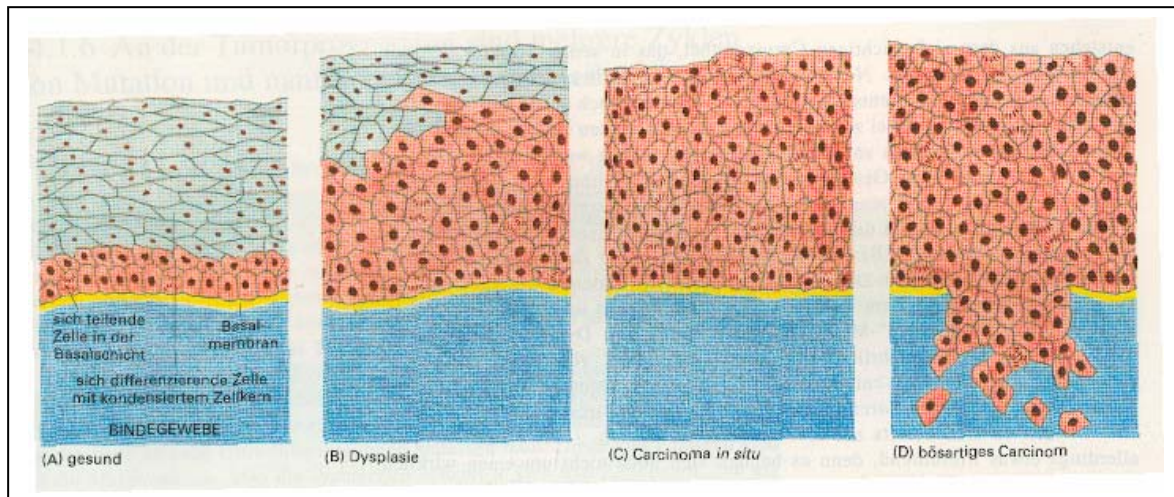


Abb. 1.3: Stadien der Karzinogenese von HNSCCs.

Gezeigt ist die schematische Darstellung der malignen Transformation nach ALBERTS *et al.* (1995).

A) Gesunde epitheliale Schleimhaut. B) Dysplasie: Die obersten Zellen sind unvollständig differenziert. Die Zellen sind insgesamt ungleich groß, und es finden vermehrt Mitosen statt. C) Carcinoma *in situ*: Das Epithel ist hochgradig atypisch verändert, jedoch ist die Basalmembran noch intakt. D) Malignes Karzinom: Die Zellen sind entdifferenziert, proliferieren stark, weisen Veränderungen in Form und Größe auf und durchbrechen die Basalmembran zur Metastasierung.

Ca. 33% aller an HNSCC erkrankten Patienten weisen Lymphknotenmetastasen auf, die zwar operativ entfernt werden können, jedoch zu 50% innerhalb von 4 Jahren nach dem Eingriff wieder auftreten (TERHAARD *et al.*, 1992). Für die Hälfte der HNSCC-Patienten ist die Erkrankung letal (AKERVALL, 1998).

1.2 Molekulargenetik von HNSCCs

Wie auch bei anderen karzinomatösen Erkrankungen ist bei HNSCCs die Regulation derjenigen Mechanismen gestört, die für die Kontrolle des Zellwachstums verantwortlich sind. Für die Entstehung dieser Störung gibt es zwei Möglichkeiten:

Zum einen kann ein Gen, das normalerweise das Zellwachstum hemmt, durch eine Mutation inaktiviert werden. Bei solchen Genen handelt es sich um **Tumor-Suppressorgene**, die auch als Anti-Onkogene bezeichnet werden (BRON und MONNIER, 1995; CAIRNS, 1986 ; BISHOP, 1986 ; OLIFF *et al.*, 1996). Zum anderen kann ein das Zellwachstum stimulierendes Gen infolge einer Mutation überaktiviert werden. Dieses mutierte Gen bezeichnet man als **Onkogen**, die unmutierte normale

Form als Proto-Onkogen. Im folgenden Text sind die wichtigsten Genveränderungen in HNSCCs aufgeführt und erläutert.

1.2.1 Tumorsuppressorgene in HNSCCs

Tumorsuppressorgene codieren in der gesunden Zelle für Proteine, die entweder im Zusammenhang mit der Zelladhäsion oder der Regulation des Zellwachstums stehen (BRON und MONNIER, 1995).

Zu den Tumorsuppressorgenen, die in die Zelladhäsion involviert sind, zählt das auf Chromosom 16q22.1 lokalisierte **CDH1-Gen**, das für das Ca^{2+} -abhängige, transmembrane Glykoprotein **E-Cadherin** (epitheliales Cadherin) codiert. In vielen Krebsmodellen wurde bereits nachgewiesen, dass der Verlust der *CDH1*-Genexpression und damit einhergehend die E-Cadherin-Repression mit der Tumordinvasion und Metastasierung korreliert (HARDISSON, 2002). Speziell in HNSCCs ist das E-Cadherin bislang nicht sehr intensiv erforscht worden, jedoch wiesen SCHIPPER *et al.* (1991) mittels *in-situ*-Hybridisierung eine Repression der E-Cadherin-mRNA-Expression in wenig differenzierten HNSCCs und infiltrierten Lymphknoten nach. Verantwortliche Mechanismen für die E-Cadherin-Repression sind sowohl der Allelverlust des *CDH1*-Gens (HARDISSON, 2002) als auch die Hypermethylierung dessen Promotorregion (YOSHIURA *et al.*, 1995).

Zu den am besten untersuchten Tumorsuppressorgenen im Kopf-Halsbereich zählt **p53**, das für ein 53kDa schweres Protein codiert. Als Transkriptionsfaktor reguliert das p53-Protein das Zellwachstum, indem es infolge eines DNA-Schadens die Transkription des *p21*-Gens induziert (21kDa schweres Protein). Durch dessen Induktion wird in der gesunden Zelle der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten, was die Reparatur des DNA-Schadens ermöglicht. Durch Verlust des normalen oder Überexpression des mutierten, inaktivierten p53-Gens geht ein Verlust der Zellwachstumskontrolle einher, was zur Karzinogenese führt. Die Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens tritt häufig bei verschiedenen karzinomatösen Erkrankungen des Menschen auf (HOLSTEIN *et al.*, 1991). Bei HNSCCs konnte eine Korrelation zwischen Veränderungen des p53-Gens und einer Überexpression des p53-Proteins nachgewiesen werden. Die Mutationen sind dabei innerhalb des konservierten Bereichs des Gens, der die Exone 5-9 umfaßt, lokalisiert, wobei

speziell die Codons 245 und 248 in Exon 7 Hot-Spot-Regionen darstellen (MAESTRO *et al.*, 1992; BRON und MONNIER, 1995). SOMERS (1992) wies unter den Mutationen eine Prädominanz für G→T-Transversionen nach, deren Auftreten mit dem Tabakkonsum der betroffenen Patienten korrelierte. MAAß (1997) konnte mittels spezieller Homogenisierungstechniken an HNSCC-Biopsaten und anschließender ELISA zu 92% eine Überexpression des p53-Proteins nachweisen und gleichzeitig eine signifikante Korrelation mit dem histologischen Differenzierungsgrad der Tumore feststellen.

Ferner sind **Veränderungen des Chromosoms 3p** für die Genese von HNSCCs von Bedeutung. LATIF *et al.* (1992) konnten im Zusammenhang mit dieser Tumorentität Allelverluste (LOH=loss of heterozygosity) in den Hot-Spot-Regionen distal des 3p14-Lokus und proximal des 3p26-Lokus nachweisen. MAESTRO *et al.* (1993) bestätigten dieses Phänomen speziell für die Region 3p21.3, in der zu 66-79% aller untersuchten HNSCCs LOHs nachgewiesen wurden. Da in dieser Region das *hMLH1*-Gen, ein wichtiges Gen zur Reparatur von Mismatch-Paarungen in der DNA, lokalisiert ist, erklärt sich die Bedeutung der dort auftretenden Mutationen für die Karzinogenese.

1.2.2 Onkogene in HNSCCs

Aufgrund ihrer Funktionen bei der Regulation der Zellwachstumskontrolle spielen Onkogene bei der Genese fast aller karzinomatöser Erkrankungen eine wichtige Rolle. Abhängig von der Aufgabe, die sie in ihrer unmutierten Form als Proto-Onkogen erfüllen, lassen sie sich in verschiedene Gruppen einteilen. Dazu gehören Wachstumsfaktoren und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Moleküle, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, und Transkriptionsfaktoren.

Zu den Onkogenen, die für Rezeptoren für Wachstumsfaktoren codieren, gehört das auf Chromosom 7p12-13 lokalisierte Gen **c-erbB**, das für den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (**EGFR**) codiert. In vielen Karzinomen, so auch in 10-25% aller HNSCCs wurde eine Überexpression von EGFR nachgewiesen (RIKIMARU *et al.*, 1992; LEONARD *et al.*, 1991; SARANATH *et al.*, 1992). Das 170kDa schwere, transmembrane Glykoprotein besitzt Tyrosin-Kinase-Aktivität und ist beteiligt an der Übertragung von Signalen ins Zellinnere.

Eine weitere Gruppe von Onkogenen, die für Signalübertragungen verantwortlich sind, bilden die Gene der **ras-Familie (c-H-, c-Ki- und N-ras)**. Sie codieren für 21kDa schwere G-Proteine (p21^{ras}), welche an der cytoplasmatischen Seite der Zelle Guanosin-Triphosphat (GTP) binden und dadurch eine Reihe von Signaltransduktionswegen regulieren. Mutationen dieser Gene sind mit der Genese vieler Malignome assoziiert und zeigen im Falle von HNSCCs eine geographisch unterschiedliche Prävalenz. So liegt die Mutationsrate von *ras*-Genen in der westlichen Welt bei lediglich 5% (YARBROUGH *et al.*, 1994), in Indien jedoch bei 35% (SARANATH *et al.*, 1991), was hier wahrscheinlich im Konsum von Kautabak-ähnlichen Substanzen begründet ist.

Eine ähnliche geographische Verteilung zeigte sich bei der Amplifikation der **myc-Onkogene (c-, N- und L-myc)** (BRON and MONNIER, 1995). Sie codieren für 62kDa schwere Transkriptionsfaktoren, die durch Anbindung an den regulatorischen Bereich des codierenden Gens direkt dessen Transkription beeinflussen. In HNSCCs konnte SARANATH (1991) zu 56% eine 5-10fache Amplifikation mehrerer *myc*-Gene außer *L-myc* nachweisen, die zudem mit fortgeschrittenen TNM-Stadien (T3 und T4) korrelierte.

Für die Genese von HNSCCs sind ferner verschiedene Onkogene von Bedeutung, die in der chromosomalen Region **11q13** lokalisiert sind. Dazu zählen die Gene *hst-1* und *int-2*, *BCL-1* und *PRAD-1* (BRON und MONNIER, 1995).

Die beiden für Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (**FGF**) codierenden Gene ***int-2*** und ***hst-1*** sind in 7-40% aller HNSCCs amplifiziert (SOMERS, 1990 und 1992). Aufgrund dieser Ähnlichkeit und ihrer nahen chromosomalen Lokalisation wurde angenommen, dass sie simultan amplifiziert werden, so wie es zumindest in anderen Karzinomen beobachtet wurde (TSUTSUMI *et al.*, 1988).

Ein weiteres Onkogen, das in der Region 11q3 lokalisiert ist, stellt das Gen ***PRAD-1*** dar. Es codiert für das Protein **Cyclin-D1**, das die Initiation der DNA-Synthese reguliert, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus kontrolliert. Infolge einer Cyclin-D1-Überexpression verkürzt sich die G1-Phase, was verstärkt zu genomischer Instabilität und erhöhter Genamplifikation führt (AKERVALL, 1998). In HNSCCs konnte zu 26-39% eine Amplifikation des *PRAD-1*-Gens nachgewiesen werden (MEREDITH *et al.*, 1995). Eine Cyclin-D1-Proteinüberexpression wurde in 39-64% von HNSCC-Primärtumoren gezeigt (AKERVALL *et al.*, 1997; MICHALIDES *et al.*, 1999).

In benignen, sowie in 22,7% der malignen Tumore des oberen Aerodigestivtraktes wurden zudem **virale Onkogene des Humanen Papilloma-Virus (HPV)** nachgewiesen (MOUNTS *et al.*, 1982; HOFFMANN, 1998). Sie stellen jedoch keine Hauptursache dieser Erkrankung dar, sondern spielen lediglich in Einzelfällen eine Rolle bei der malignen Entartung (BRON und MONNIER, 1995).

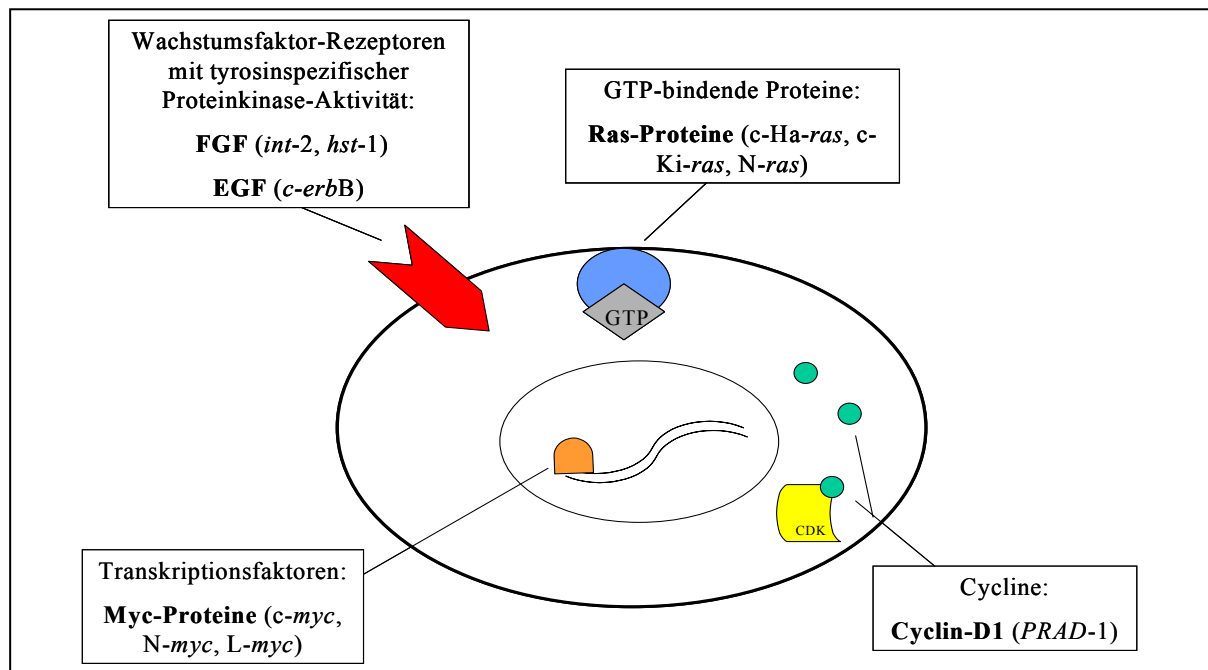


Abb. 1.4: Onkogene in HNSCCs.

Das obige Bild zeigt die schematische Darstellung einer Zelle inklusive der in HNSCCs vorkommenden Proteine, die von Onkogenen (in Klammern stehend) codiert werden.

1.3 Herkömmliche Therapie von HNSCCs und ihre Problematik

Obwohl HNSCCs unterschiedliche Lokalisationen aufweisen, ist ihre Behandlung prinzipiell gleich. Bei der Mehrzahl aller Patienten gelingt es, einen Primärtumor von geringer Ausdehnung und bei noch nicht erfolgter Lymphknoteninfiltration durch chirurgische Maßnahmen oder durch gezielte Bestrahlung im Rahmen einer Strahlentherapie zu entfernen (WERNER, 1998).

Die **chirurgische Entfernung** ist aus dem Grunde vorteilhaft, da sie schnell und wirksam ist, jedoch muß bei ihr eine großräumige Extirpation des gesunden Gewebes um den Tumor herum erfolgen, um auch die für Malignome typischen mikroskopischen Ausläufer zu erfassen. Ferner wird als Präventivmaßnahme in

einigen Fällen zusätzlich eine *neck dissection* (Entfernung der Lymphknoten) auf der betroffenen Seite durchgeführt. Folglich muß der Patient z.T. schwere Funktionseinbußen und Verstümmelungen des betroffenen Organs hinnehmen (HELLMAN und VOKES, 1996).

Die **Bestrahlung** ist dagegen wesentlich schonender für den Patienten. Hier wird der Tumor gezielt intensiven Röntgen- oder Gammastrahlen ausgesetzt, wodurch dessen Zellen genetische Schäden zugefügt werden oder Apoptose in ihnen induziert wird. Miterfaßte gesunde Zellen erholen sich von der Bestrahlung wieder, so dass das gesunde Gewebe um den Tumor erhalten werden kann (HELLMAN und VOKES, 1996).

Sowohl die chirurgische Entfernung als auch die Bestrahlung haben jedoch den Nachteil, dass oft nicht alle Krebszellen von der Behandlung erfasst werden und dass diese Methoden bei bereits metastasierten Karzinomen nutzlos sind (HELLMAN und VOKES, 1996). Gerade aber die hohe Metastasierungsfrequenz auf dem Lymphweg und die häufig erst im späteren Krankheitsverlauf auftretenden Fernmetastasen begründen die hohe Sterberate von HNSCC-Patienten. Zudem kommt es häufig zum Auftreten von Zweitkarzinomen im oberen Aerodigestivtrakt (WERNER, 1998).

Bei fortgeschrittenen, metastasierten Karzinomen kann eine **Chemotherapie** als präoperative Behandlung oder in Kombination mit einer Strahlentherapie eingesetzt werden. Hierbei werden dem Patienten Medikamente verabreicht, die das Wachstum schnell wachsender Zellen hemmen und z.T. wie bei der Bestrahlung Apoptose in ihnen induzieren. Der Nachteil dieser Behandlung besteht darin, dass auch gesunde Zellen, vor allem Epithelzellen der Darm- und Mundschleimhaut, die natürlicherweise eine hohe Mitoserate haben, abgetötet werden und folglich bei den Patienten schwere Nebenwirkungen auftreten. Ferner bilden manche Tumoren Resistenzen gegen die verabreichten und andere Medikamente aus (HELLMAN und VOKES, 1996; VARMUS und WEINBERG, 1992).

1.4 Molekularbiologische Ansätze zur Therapie von HNSCCs und ihre Problematik

Die gegenwärtig angewendeten Therapiemaßnahmen an HNSCCs wie chirurgische Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie haben sich innerhalb der letzten 10 Jahre nicht weiter verbessert. In der gleichen Zeit wuchs jedoch durch den vermehrten Einsatz molekularbiologischer Techniken in der Onkologie das Verständnis über die Biologie von Malignomen im Kopf-Hals-Bereich respektive genetischer Veränderungen bei der malignen Transformation, Tumorprogression und Metastasierung (DAVIDSON und SCHANTZ, 1988). Auf diesem Wissen aufbauend ergeben sich neue Perspektiven für alternative Therapieformen.

Bereits in der Entwicklung befindet sich die **somatische Gentherapie**, die darauf abzielt, einen Gendefekt durch Integration des gesunden Gens in die Karzinomzellen zu kompensieren, was eine kausale Behandlung ohne Nebenwirkungen ermöglichen soll. Um das gesunde, „therapeutische“ Gen in die DNA der Tumorzellen einzuschleusen, wird es zunächst mit Teilen des Genoms eines Retrovirus rekombiniert. Nach Einschleusen in die Zielzellen ist das modifizierte Virusgenom zu einer Integration in das Wirtszellgenom fähig (Provirus), so dass das therapeutische Gen von diesen Zellen exprimiert werden kann. Aufgrund gezielter Manipulation des Virusgenoms ist das Retrovirus jedoch nicht in der Lage, sich zu vermehren und auf andere Zellen auszubreiten. Das Prinzip der Herstellung eines therapeutischen Provirus ist an Abb. 5 dargestellt. Die Problematik dieser Heilungsmethode besteht vor allem in der Komplexität der Genese von HNSCCs, d.h. es ist nicht nur der Defekt eines einzelnen Gens für die maligne Transformation verantwortlich, sondern der Defekt mehrerer Gene. Da viele molekulare Ursachen für die Karzinogenese bislang noch nicht erforscht sind, können auch keine entsprechend wirksamen therapeutischen Proviren konstruiert werden (Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, 2001).

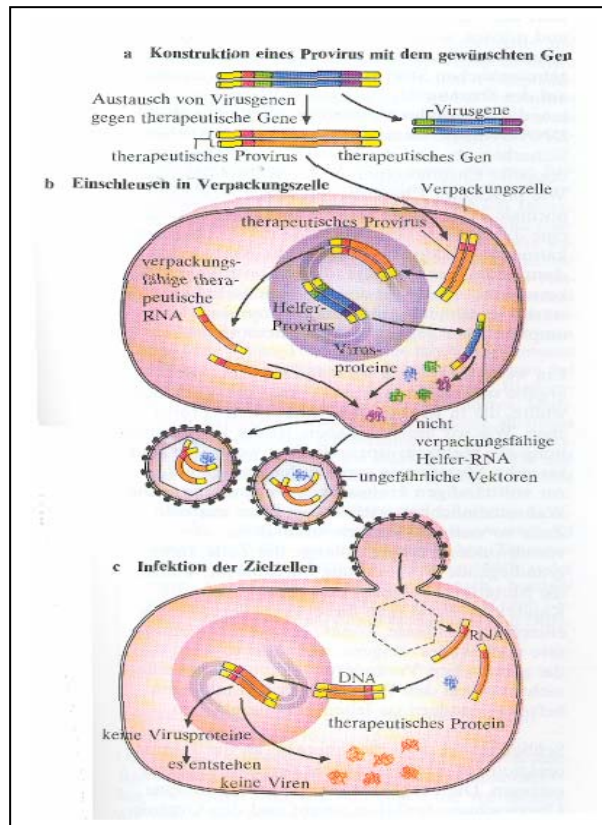


Abb. 1.5: Prinzip der somatischen Gentherapie nach VARMUS und WEINBERG (1992).

a) Konstruktion des therapeutischen Provirus: Das therapeutische Gen wird mit Teilen des Genoms eines Retrovirus rekombiniert.

b) Einschleusen in eine Verpackungszelle: Das therapeutische Provirus wird zusammen mit einem Helfer-Provirus in eine Verpackungszelle eingeschleust. Diese synthetisiert nach Codierung des Helfer-Provirus Viruspartikel, in die das therapeutische Gen eingeschleust wird. Stattdessen umhüllen die Partikel das Retrovirus, das das therapeutische Gen enthält und somit in andere Zellen eindringen kann.

c) Infektion der Zielzellen: Die Karzinomzellen werden mit dem therapeutischen Retrovirus „infiziert“. Durch Integration des Virus in das Wirtszellgenom wird das dort defekte Gen ersetzt. Als Folge gezielter genetischer Manipulation kann das Retrovirus keine Viruspartikel herstellen.

Eine weitere alternative Therapieform stellt die **Immuntherapie** dar, die sich ebenfalls in der Entwicklung befindet. Hierbei macht man sich die Präsenz von Tumorzell-spezifischen Antigenen, z.B. bestimmten Oberflächenproteinen auf den Tumorzellen zu Nutze. Durch Impfung des Patienten mit einem monoklonalen Antikörper gegen dieses spezifische Tumor-Antigen soll das körpereigene Immunsystem dazu provoziert werden, die Tumorzellen selektiv abzutöten. Diese Wirkung kann unterstützt werden, indem die monoklonalen Antikörper als Vehikel für toxische Substanzen genutzt werden und diese selektiv zu den Tumorzellen transportieren. Schwierigkeiten bei der Entwicklung solcher Immuntherapien ergeben sich dahingehend, als dass sich Karzinomzellen auf unterschiedliche Art und Weise Angriffen des Immunsystems entziehen können, z.B. durch unspezifische Immunsuppression oder durch Abschirmung über eine dicke Stroma-Schicht, die weder Immunzellen noch Antikörper durchdringen können.

Das Wissen über die Biologie von Kopf-Hals-Karzinomen kann neben der Weiterentwicklung der genannten alternativen Therapieformen zur innovativen Entwicklung von Medikamenten genutzt werden, die entweder gezielt am defekten

Gen, an der Steuerung seiner Expression oder der Expression seines Proteins angreifen. Die wirksamste Verbesserung der Heilungschancen für HNSCCs liegt jedoch bereits in der Früherkennung, da ein Tumor von geringer Ausdehnung und noch nicht erfolgter Metastasierung leichter behandelt werden kann. Hier ermöglicht die Kenntnis über die genetischen Grundlagen der Entartung, den Patienten auf eine Veranlagung für bestimmte Tumorentitäten zu testen, Frühwarnungen zu geben oder aber den Grad der Tumorprogression festzustellen. Zudem können Voraussagen getroffen werden, wie ein Patient auf verschiedene Behandlungsformen anspricht (HELLMAN und VOKES, 1996).

Als Ansatzpunkt zur Weiterentwicklung molekularer Behandlungsstrategien und zur besseren Prognose ist es wichtig, möglichst viele für eine Tumorart typische genetische Abnormitäten zu identifizieren und zu charakterisieren. CALIFANO *et al.* (1996) entwickelten ein vorläufiges Modell für die Tumorprogression bei HNSCCs, das auf häufig beobachteten genetischen Unterschieden bei der Initiation und Entwicklung maligner Plattenepithelkarzinome basiert. Danach können LOHs in der chromosomalen Region 9p bereits in benignen Tumoren und beginnenden Läsionen beobachtet werden, sowie Deletionen in den Loci 3p und 17p bei Dysplasien. Deletionen in 11q, 13q und 14q sind dagegen mit Karzinomen assoziiert, und Deletionen in 6p, 8p und 4q treten lediglich bei invasiven Tumoren auf. Für die Tumorprogression sei ferner die Akkumulation und nicht die Reihenfolge der Mutationen entscheidend.

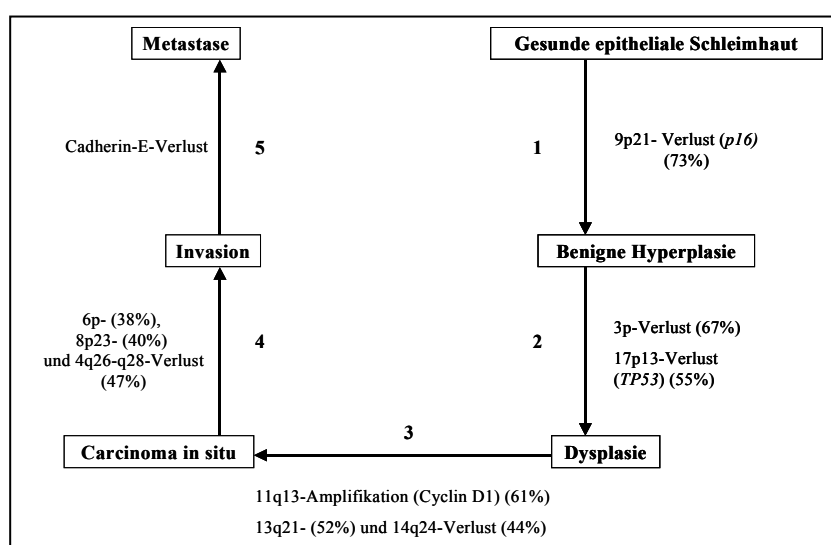


Abb. 1.6: Molekulares Modell für die Karzinogenese von HNSCCs in Anlehnung an CALIFANO *et al.* (1996).

Derartige Modelle bieten möglicherweise gute Ansätze hinsichtlich der Identifizierung und Charakterisierung von Tumormarkern. Aufgrund der geringen Prävalenz von Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen mit einem Anteil von 6% aller Malignome ist diese Tumorentität jedoch im Vergleich zu anderen karzinomatösen Erkrankungen in molekulargenetischer Hinsicht bislang weniger gut charakterisiert. Vor diesem Hintergrund erklärt sich die Notwendigkeit der Erweiterung des molekulardiagnostischen Repertoires dieser Karzinome, wofür sich verschiedene molekularbiologische Analyseverfahren anbieten.

Um bisher unbekannte mit der Erkrankung assoziierte Gene aufspüren und identifizieren zu können, wurde zu Beginn dieser Doktorarbeit eine innovative mRNA-Differential-Display-Methode angewandt, die sich für vergleichende Untersuchungen des gesamten mRNA-Spektrums maligner und gesunder Zellen eignet. Vorwegnehmend sei an dieser Stelle erwähnt, dass mit Hilfe dieser Methode die Detektion der Überexpression eines Genfragmentes gelang. Weitere Analysen an diesem Fragment ergaben, dass es sich dabei um einen Abschnitt der codierenden Region eines Lysyl-Oxidase-Gens handelte, das bis dato noch nicht in Assoziation mit HNSCCs erforscht worden war. Aus diesem Grund bestand die Zweckmäßigkeit, das Gen mit Hilfe diverser molekularbiologischer Methoden in Zusammenhang mit dieser Tumorentität genauer zu charakterisieren.

1.5 Die Rolle der Lysyl-Oxidasen

Lysyl-Oxidasen bilden eine Familie Kupfer-abhängiger Amin-Oxidasen, die starke Homologien in ihrer Gensequenz aufweisen. Diese Ähnlichkeit bezieht sich besonders auf ihre C-terminale Domäne, die eine Kupfer-Bindungsstelle sowie konservierte Lysyl- und Tyrosyl-Reste beinhaltet, die am Aufbau eines Lysyl-Tyrosyl-Quinon-Cofaktors beteiligt sind (MÄKI und KIVIRIKKO, 2001; WANG, 1996; MOLNAR *et al.*, 2003). Die N-terminale Region ist dagegen nur bei den Isoformen LOXL2, LOXL3 und LOXL4 ähnlich aufgebaut und bei diesen durch den Besitz von 4 SRCRs (scavenger receptor cysteine rich domains) gekennzeichnet, weshalb sie oft als Unterfamilie der Lysyl-Oxidasen zusammengefasst werden (ASUNCION *et al.*, 2001).

Die SRCR-Superfamilie beinhaltet vorwiegend Zelloberflächenproteine, die mit dem Immunsystem assoziiert sind und wahrscheinlich eine Rolle bei Zelladhäsionsvermittelnden Protein-Interaktionen spielen. Daher ist anzunehmen, dass die LOX-like-Proteine mit der Zelloberfläche in Verbindung stehen (MOLNAR *et al.*, 2002). Allen Lysyl-Oxidasen gemeinsam ist der Besitz eines Signalpeptids, das aber wahrscheinlich nicht essentiell für die Faltung, die katalytische Funktion und die Sekretion des jeweiligen Proteins ist (KAGAN *et al.*, 1995).

Ursprünglich waren die Lysyl-Oxidasen lediglich als extrazellulär aktive Enzyme bekannt, die die Vernetzung von Kollagen und Elastin in der extrazellulären Matrix katalysieren und damit für deren Stabilisierung verantwortlich sind (KAGAN und TRACKMAN 1991; SIEGEL 1970; RUCKER *et al.* 1998). Seit einiger Zeit schreibt man ihnen jedoch weitere Funktionen im intrazellulären und sogar im intranucleären Bereich zu (WAKASAKI und OOSCHIMA, 1997; LI *et al.*, 1997). Dazu zählen z.B. die Regulation von Entwicklungsprozessen (CECIL *et al.*, 1997), Zellwachstumskontrolle (CSISZAR, 2001), Funktionen in der Zelladhäsion und Seneszenz (SAITO *et al.*, 1997) sowie die Tumorsuppression (GIAMPUZZI *et al.*, 2001; CONTENTE *et al.*, 1999). Diese unterschiedlichen Aufgaben werden wahrscheinlich von den verschiedenen Isoformen der Lysyl-Oxidasen in zeitlicher und räumlicher Regulation ausgeführt (CSISZAR, 2001). Bislang sind fünf Mitglieder dieser Enzymfamilie bei Menschen bekannt:

LOX – Das Gen für die zuerst beschriebene Lysyl-Oxidase mit der Kurzbezeichnung LOX ist auf Chromosom 5q23.3-q31.2 lokalisiert (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 1991). Es codiert für ein 50kDa schweres Vorläuferprotein, das in den Extrazellulärraum sezerniert wird und erst dort zu der enzymatisch aktiven 30kDa-Form prozessiert wird (TRACKMAN, 1992). Jedoch wurde auch die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms nachgewiesen (LI *et al.*, 1997). LOX wurde u.a. in fetalen Membranen und der Placenta gefunden (HEIN *et al.*, 2001) und hat neben der Vernetzung von Kollagen und Elastin in der extrazellulären Matrix auch eine Funktion bei der Regulation von Entwicklungsprozessen, bei der Zellbewegung und als Tumorsuppressorgen (MARIANI *et al.*, 1992; PEYROL *et al.*, 1997; CSISZAR, 2001).

LOXL – Bei LOXL (Lysyl oxidase like enzyme) handelt es sich um ein extrazellulär aktives Enzym von ca. 63kDa (KENYON *et al.*, 1993), das zusätzlich zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix (SZABO *et al.*, 1997) auch in Zelladhäsions- und Seneszenz-Prozesse involviert ist (SAITO *et al.*, 1997). Zudem wurde eine Co-

Regulation mit Typ III Kollagen bezüglich des mRNA-Levels in Leberfibrose nachgewiesen (KIM *et al.*, 1999). Das für LOXL codierende Gen ist auf Chromosom 15q23 lokalisiert (KENYON *et al.*, 1993; SZABO *et al.*, 1997).

LOXL2 – Das 87kDa schwere LOXL2-Enzym ist in der extrazellulären Matrix aktiv, konnte aber auch intrazellulär nachgewiesen werden (FONG *et al.*, 2000). Wegen seiner 4 SRCR-Domänen in der N-terminalen Region wurde über eine Bindung an Moleküle der extrazellulären Matrix spekuliert (SAITO *et al.*, 1997). LOXL2 konnte in fast allen Geweben nachgewiesen werden, die höchste mRNA-Expression zeigte sich dabei in der Placenta, im Uterus und in der Prostata (JOURDAN-LE SAUX *et al.*, 1999). Das zugehörige Gen ist auf Chromosom 8p21.2-p21.3 lokalisiert (JOURDAN-LE SAUX *et al.*, 1998).

LOXL3 – Das LOXL3-Gen ist auf Chromosom 2p13.3 lokalisiert (JOURDAN-LE SAUX *et al.*, 2001) und codiert für ein 97kDa schweres Protein (MOLNAR *et al.*, 2002). Eine LOXL3-mRNA-Expression konnte in vielen Geweben nachgewiesen werden, die höchste Expression wurde aber in Placenta, Herz, Ovarien, Hoden, Dünndarm und Milz gefunden (MÄKI *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den übrigen Lysyl-Oxidasen wird LOXL3 auch im zentralen Nervensystem, in Neuronen und Leukozyten exprimiert, weshalb ihm dort neben der Amin-Oxidase-Aktivität noch andere Funktionen zugeschrieben werden (JOURDAN-LE SAUX *et al.*, 2001).

LOXL4 – Das jüngste Mitglied der LO-Familie ist das Enzym LOXL4 mit einer Größe von ca. 84,5kDa (MÄKI *et al.*, 2001). Mit seinen 4 SRCR-Domänen in der N-terminalen Region weist es große Ähnlichkeit zu LOXL2 und LOXL3 auf und ist wahrscheinlich ein in der extrazellulären Matrix aktives Enzym (MÄKI *et al.*, 2001). Das für LOXL4 codierende Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert. Das zugehörige mRNA-Molekül hat eine Länge von ca. 3,5kb und wird in vielen Geweben exprimiert, die höchsten Expressionslevel findet man jedoch in Pankreas und Hoden (ASUNCION *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird das LOXL4-Gen erstmals in Assoziation mit Kopf-Hals-Karzinomen untersucht.

1.6 Zielsetzungen

Das in etablierten HNSCC-Zellkulturen nachgewiesene differentiell exprimierte Genfragment sollte unter verschiedenen molekularbiologischen Gesichtspunkten analysiert werden:

- Zuerst sollte gezeigt werden, ob das mit Hilfe der Differential-Display-Methode nachgewiesene Genfragment in Kopf-Hals-Karzinomen eine reproduzierbare Überexpression aufweist. Nach der Isolierung war das Genfragment zu reamplifizieren und zu klonieren. Um über die Natur des Gens Aussagen treffen zu können, war das Fragment zu sequenzieren und einem Homologievergleich mit Sequenzen bekannter Gene in der Human GenBank zu unterziehen.
- Zum Nachweis der Spezifität der Überexpression des Genfragmentes und zur Bestimmung der Größe des zugehörigen mRNA-Moleküls galt es mittels einer genspezifischen cDNA-Sonde Northern Hybridisierungen durchzuführen.
- Um die vollständige Sequenz des mRNA-Moleküls zu rekonstruieren, sollte der bis dato unbekannte 5'-distale Bereich durch RACE-Technik (rapid amplification of cDNA-ends) erfasst werden.
- Die Spezifität der differentiellen Expression des gefundenen Gens sollte in einer statistisch repräsentativen Anzahl von etablierten HNSCC-Zelllinien, entsprechenden malignen und benignen Biopsaten und dem gesunden Zelltyp mittels Northern Hybridisierung demonstriert werden.
- Die Differential-Display-Technik erlaubt zwar eine vergleichende Darstellung des mRNA-Expressionsprofils der zu untersuchenden Zellpopulationen, jedoch liefert sie keinen genauen Aufschluß über die Art der Regulation nachgewiesener Genfragmente. Um dieser Frage näher kommen zu können, sollte die transkriptionelle Regulation des in den Karzinomzellen detektierten differentiell exprimierten Genfragmentes verifiziert werden. Dies kann erfolgen,

indem zwischen der Expressionsrate des Genfragmentes und dessen Transkriptionsrate im Nuclear-Run-On eine Korrelation gezeigt wird.

- In weiteren Analysen galt es, die vollständige Länge des Gens zu erfassen. Anhand der nun bekannten mRNA-Sequenz und partieller in der GenBank vorliegender genomischer DNA-Sequenzen waren Alignments aufzustellen und dadurch die Organisation von Exons und Introns zu ermitteln.
- Um der Ursache der differentiellen Expression nachzugehen, sollte auf unterschiedlichen Ebenen nach molekularen Alterationen gesucht werden, die mit der Veränderung der Regulation des Gens in Zusammenhang gebracht werden könnten. Zu dieser Thematik waren folgende Analyseschritte auszuführen:
 1. Ein Vergleich der Exonsequenzen zwecks Mutagenese (Punktmutationen, Deletionen, Insertionen) als Hinweis auf funktionelle Veränderungen des Proteins.
 2. Ermittlung und Vergleich der 5'-flankierenden Region respektive Targetsequenzen für Transkriptionsfaktoren.
 3. Charakterisierung spezifischer Promotorregionen mittels a) Lipofectin-vermittelter transienter Transfektion von Reportergenkonstrukten und b) Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay.
 4. Nachweis chromosomaler Lokalisation des LOXL4-Gens und Assoziation der differentiellen Genexpression mit intrachromosomalen Aberrationen.

2 Material

Alle verwendeten Materialien wie Chemikalien, Kits, Antikörper, Plasmidvektoren, Puffer, Lösungen, Nährmedien, Laborgeräte und Laborzubehör sind in entsprechenden Tabellen im Anhang dieser Arbeit unter 9.1 aufgeführt. Angaben über die jeweiligen Hersteller sowie Zusammensetzungen von Lösungen o. ä. sind im folgenden Text nicht weiter ausgeführt, sondern ebenfalls den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

3 Methoden

3.1 Zellkulturen und Gewebebiopsate

Alle Zellkulturexperimente wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Für die Verwendung von Gewebebiopsaten für wissenschaftliche Experimente lag eine schriftliche Zustimmung der jeweiligen Patienten entsprechend einer von der Ethikkommission des Kieler Universitätsklinikums befürworteten mündlichen und schriftlichen Patientenaufklärung vor. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-haltiger Atmosphäre. Um die Zellen auf ihr homogenes Wachstum und eventuelle Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu überprüfen, wurden sie täglich unter einem inversen Lichtmikroskop betrachtet. Alle Röhrchen, Tubes, Pipettenspitzen und Pinzetten waren vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven bei 110°C und 2bar für 20min sterilisiert worden. Lösungen und Medien für die Zellkultur wurden ebenfalls vor ihrer Verwendung bei 110°C für 20min autoklaviert oder, falls hitzelabil, sterilfiltriert.

3.1.1 Kultivierung von Plattenepithelkarzinomzelllinien

Als Ausgangsmaterial für *in-vitro*-Untersuchungen dienten verschiedene Plattenepithelkarzinomzelllinien, die aus Kopf-Hals-Karzinomen desintegriert worden waren (HNSCC: *engl.* head and neck squamous cell carcinoma). Es handelte sich um gut charakterisierte Karzinomzelllinien, deren Herkunft und histopathologische Parameter im Anhang dieser Arbeit in Tabelle 9.2.1 zusammengefaßt sind. Von jeder Tumorzelllinie standen Subkulturen zur Verfügung, die für ihre Langzeitlagerung in Cryotubes in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Um sie in Kultur zu bringen, wurden sie unter sterilen Bedingungen bei 37°C aufgetaut und zusammen mit 5ml Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) in ein 15ml-Tube überführt. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 800rpm (Centrifuge 5804 R: Eppendorf, Köln, Germany) wurde der Überstand verworfen, womit das DMSO-haltige Einfriermedium entfernt wurde. Das Zellpellet wurde anschließend in 10ml frischem DMEM resuspendiert und in eine sterile Kulturflasche (75cm²) überführt. Bei anschließender Kultivierung im Brutschrank hefteten sich die Zellen binnen 24std am Boden der Kulturflasche fest und wuchsen dort adhärent als Monolayer. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit wurde alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei erreichter Konfluenz wurden die Zellen entweder im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen gesplittet oder für weiterführende Versuche abgeerntet. In beiden Fällen wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellen abgegossen und anschließend eine Trypsin/EDTA-Lösung (Endkonz. 1x in PBS) auf die Zellen gegeben, mit der sie für 10-15min im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Dabei lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche ab. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 15ml-Tube überführt, und die Zellen durch Zentrifugation bei 800rpm für 5min (Centrifuge 5804 R) pelletiert. Zur Weiterkultivierung wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen ausgesät. Um die Zellen in weiteren Versuchen, wie z.B. RNA-Isolierung, einzusetzen, wurde das durch die Zentrifugation erhaltene Zellpellet entweder direkt aufbereitet oder für eine spätere Verwendung bei -80°C in dem 15ml-Tube eingefroren.

3.1.2 Präparation und Kultivierung gesunder Epithelzellen

Für vergleichende *in-vitro*-Untersuchungen wurden als Gegenstück zu den malignen Tumorzellen gesunde epitheliale Schleimhautzellen aus dem oberen Aerodigestivtrakt kultiviert. Diese wurden aus frischen Biopsaten nasaler und oropharyngealer Mucosa isoliert, die bei Operationen als Sektionsränder anfielen. Unmittelbar nach ihrer Entnahme wurden die Schleimhautstücke in 15ml-Tubes mit 3ml Transportmedium überführt und bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung (max. 8std) auf Eis gehalten. Im Zellkulturlabor wurden die Gewebestücke unter sterilen Bedingungen in eine Petrischale überführt und mit Hilfe einer Pinzette und einem Skalpell von Knorpel und Knochenstücken befreit. Das Gewebe wurde danach mit PBS gewaschen und in etwa 4-6mm³ Stücke zerschnitten. Diese wurden in einem 15ml-Tube mit 3ml Dispase-Lösung (2U/ml in 1xPBS) inklusive 12U/ml Penicillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Durch Einwirkung der Dispase wurde die aus gesunden Epithelzellen bestehende Schleimhaut (*Lamina epithelialis mucosae*) von der darunterliegenden Dermis gelöst. Am folgenden Tag wurden die Gewebestücke erneut unter der Sterilbank in eine Petrischale überführt und die Epithelschicht mittels eines Skalpells vorsichtig als feines Häutchen vom Rest des Gewebes abgezogen. Die Epithelzellhäutchen wurden in 5ml PBS resuspendiert und in einem sterilen 15ml-Tube bei 800rpm für 5min (Centrifuge 5804 R) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Zellen in 10ml Trypsin/EDTA-Lösung (Endkonz. 0,1x in PBS) und eine anschließende Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 20min. Während dieser Inkubationsphase wurden die Zellaggregate unter der Einwirkung des Trypsins in Einzelzellen dissoziiert. Nach dieser Inkubation wurden die Epithelzellen erneut für 5min bei 800rpm (Centrifuge 5804 R) abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde zum Abstoppen der Trypsineinwirkung in 5ml FCS resuspendiert und ein wiederholter Zentrifugationsschritt durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 10ml Keratinocytenmedium (KGM; Clonetics) resuspendiert und in eine 75cm² Kulturflasche überführt. Anschließend wurden sie im Brutschrank kultiviert, wobei sie bereits 24std nach Aussaat adhärent als Monolayer in der Kulturflasche wuchsen. Etwa alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Bei erreichter Konfluenz wurden die

Zellen analog der für Plattenepithelkarzinomzellen beschriebenen Weise abgeerntet (siehe 3.1.1).

3.1.3 Tumorbiopsate

Neben Zellkulturen wurden auch Biopsate maligner Kopf-Hals-Karzinome sowie entsprechender benignen Tumore als Ausgangsmaterial für *in-vitro*-Untersuchungen verwendet. Ihre Herkunft und histopathologischen Parameter sind im Anhang in Tabelle 9.2.1 zusammengefaßt. Die Biopsate wurden bei notwendiger Extirpation des jeweiligen Gewebestückes von Patienten entnommen und unmittelbar danach in Cryotubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung der Präparate erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80°C .

3.2 RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellkulturen und Biopsaten

Die Isolierung von Gesamtzell-RNA wurde mit Hilfe des Trizol-Reagenzes durchgeführt. Konfluente Zellkulturen (75cm²-Kulturflaschen) wurden hierzu einzeln abgeerntet (siehe 3.1.1), die Zellpellets in jeweils 1ml Trizol-Reagenz resuspendiert und in ein 1,5ml-Tube überführt. Mittels Scheren der Suspension durch eine Insulinspritze wurden die Zellen homogenisiert.

Für die RNA-Extraktion wurden die Proben nach Zugabe von 200µl Chloroform für 15sec gevortext, anschließend für 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4°C bei 12000 rpm für 15min (Centrifuge 5417 R: Eppendorf; Köln, Germany) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der klare, RNA-enhaltende Überstand quantitativ von jeder Probe abgenommen und in jeweils ein Tube mit 500µl Isopropanol überführt. Das Sediment, bestehend aus Proteinen, DNA und Membranfragmenten wurde verworfen.

Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Präzipitation der RNA. Hierzu wurden die Proben nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 10min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417 R) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde durch Zugabe von 1ml 75%igem Ethanol und erneuter Zentrifugation

bei 4°C und 7500rpm für 5min (Centrifuge 5417 R) gewaschen. Anschließend wurde das Ethanol quantitativ abgesaugt, das RNA-Pellet für 20min bei Raumtemperatur im offenen Tube getrocknet und letztlich in 50µl 50%igem (v/v) Formamid durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe 3.3) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei –80°C eingefroren.

Um RNA aus Tumorbiopsaten zu isolieren, wurde das jeweilige tiefgefrorene Gewebestück in einen Porzellantigel gegeben, der in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporwanne gekühlt wurde. Mit einem Porzellanpistill wurde das Gewebe fein gemörsert und mit 1ml Trizol-Reagenz pro 0,1mg vermengt. Das pulverisierte Gewebe/Trizol-Gemisch wurde kurz im Wasserbad bei 55°C aufgetaut, die Suspension mittels Scheren durch eine Insulinspritze homogenisiert und in 1ml-Aliquots auf 1,5ml-Tubes verteilt. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 4°C und 8000rpm für 10min (Centrifuge 5417 R), um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in frische 1,5ml-Tubes überführt und aus ihm die RNA analog der zuvor beschriebenen Weise extrahiert.

3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Proben erfolgte durch Messung ihrer Absorption bei 260nm gegenüber einem Leerwert aus 50%igem Formamid in Quartz-Küvetten in einem UV-Spektralphotometer. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes ließ sich aus der Absorption die Konzentration einer RNA-Probe ermitteln. Dieses Gesetz konnte bei konstanter Wellenlänge, gleichbleibender Eingangslichtintensität und konstanter Schichtdicke der Küvetten von 1cm zu folgender Formel vereinfacht werden: **$C=A \times f$**

Dabei ist C=Konzentration der Probe in µg/µl, A=gemessene Absorption und f=Umrechnungsfaktor für die zu messende Substanz, der in diesem Falle für RNA 0,4µg/µl beträgt.

3.4 Analyse der RNA-Qualität durch Elektrophorese

Die Analyse der RNA-Qualität erfolgte durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel. Für dessen Herstellung wurde 1g Agarose in 100ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) und 50xTAE-Puffer (Endkonz. 1x) durch Kochen in der Mikrowelle geschmolzen und der Gel-Lösung anschließend 10µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) zugefügt. Je 1µg der zu testenden RNA-Proben wurde mit 6xRNA-Loadingbuffer (Endkonz. 1x) vermischt und auf das auspolymerisierte Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 80V für 90min (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA). Die anschließende optische Auswertung des Gels erfolgte mit einem UV-Spektrometer. Bei intakten RNA-Proben waren lediglich die 18- und 28-Svedberg-Bande der ribosomalen RNA zu erkennen. Zusätzliche Banden deuteten auf das Vorhandensein unerwünschter Spaltprodukte der RNA, entstanden durch Degradation, hin. Derartige Proben wurden sogleich verworfen.

3.5 Reverse Transkription der mRNA

Für die cDNA-Synthese wurde SuperScript II (Invitrogen), eine modifizierte reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) mit einem Arbeitsoptimum bei 44°C, verwendet. Zur Durchführung der reversen Transkription wurden zunächst zwei verschiedene Reaktionsansätze in 0,5ml-Tubes zusammenpipettiert. Der erste Ansatz aus 1µg RNA-Probe, 1µl Oligo-dT₁₂-Primer (20µM) und DEPC-H₂O ad 8µl wurde in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 10min auf 70°C erhitzt und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation bei 4°C.

Der zweite Ansatz aus 5x1st Strand Buffer (Endkonz. 1x), 2µl DTT (0,1M), 5µl dNTP's (2mM) und 1µl SuperScript II wurde nach seiner Fertigstellung komplett zu dem ersten Ansatz gegeben und mit diesem gut vermischt. Das Reaktionsgemisch von insgesamt 20µl wurde in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 15min auf 37°C erhitzt. Anschließend erfolgte eine

Inkubation bei 44°C für 45min und bei 70°C für 15min. Die fertige cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.6 Northern Hybridisierung

3.6.1 RNA-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde ein 1%iges, formaldehydhaltiges Gel vorbereitet. Dazu wurde 1g Agarose in 1xMOPS-Puffer und DEPC-H₂O ad 100ml durch Kochen in der Microwelle geschmolzen und der Gel-Lösung anschließend 2ml 35%iges (v/v) Formaldehyd beigefügt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (B3: Owl Separation Systems; Portsmouth, USA) mit 1,2l Laufpuffer, bestehend aus 1xMOPS-Puffer, 24ml 35%igem Formaldehyd (v/v) und DEPC-H₂O überführt.

Jeweils 10µg einer RNA-Probe wurden in ein 0,5ml-Tube überführt, mit 5xRNA-Loadingbuffer (Endkonz. 1x) vermischt, und in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 3min auf 65°C erhitzt. Unmittelbar danach wurden die Proben für ca. 2min auf Eis gestellt und kurz bei 0°C zentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde eine 2 1/2-stündige Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 80V durchgeführt.

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit Hilfe eines UV-Spektrometers optisch überprüft und abfotografiert und nacheinander für jeweils 15min in DEPC-H₂O, in 50mM NaOH und in 10xSSC-Lösung auf einem Shaker rotierend gewaschen. Danach wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und die RNA durch 1 ½-stündiges Blotting bei 60mbar Unterdruck auf diese übertragen. Anschließend wurde die Membran kurz in 2xSSC-Lösung gewaschen, für einige Minuten auf Filterpapier luftgetrocknet und zur Fixierung der RNA in einem Crosslinker bei 1200µJ mit UV-Licht bestrahlt.

3.6.2 Herstellung Digoxigenin-markierter cDNA-Sonden

Zwecks Detektion der LOXL4-mRNA durch Northern Hybridisierung wurde eine für dieses Molekül spezifische, Digoxigenin(DIG)-markierte cDNA-Sonde von 639bp Länge (Acc. No. AK025542, Pos. 1268-1907) hergestellt. Die Amplifikation und Markierung des Sondenabschnitts erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer in einer modifizierten PCR (siehe 3.15) unter Verwendung des „PCR DIG Probe Synthesis Kits“ nach Angaben der Firma Roche. Die Primersequenzen und verwendeten PCR-Parameter sind im Anhang in Tabelle 9.3.1 aufgeführt. Als Template wurde cDNA der HNSCC-Zelllinie UT-SCC-19A eingesetzt. Das gesamte PCR-Produkt wurde mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein 1,2%iges Agarosegel (siehe 3.4) aufgetragen. Nach einer 90-minütigen Elektrophorese (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) bei einer konstanten Spannung von 80V erfolgte die optische Überprüfung des PCR-Produktes in einem UV-Spektrometer. Die DIG-markierte Sonde wurde aus dem Gel ausgeschnitten, isoliert (siehe 3.16) und einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 3.14) unterzogen.

Nach diesem Verfahren wurde neben der LOXL4-cDNASonde (639bp) auch eine 360bp lange cDNA-Sonde für das Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; Acc. No. BC029618, Pos. 28-387) hergestellt. Die dafür verwendeten Primer und PCR-Parameter sind ebenfalls im Anhang in Tabelle 9.3.1 angegeben.

3.6.3 Northern-Hybridisierung

Der fertiggestellte Blot wurde mit der RNA-tragenden Seite nach oben in vorgewärmter „DIG Easy Hyb-Lösung“ der Firma Roche für 1std in einem rotierenden Hybridisierungssofen bei 50°C prähybridisiert. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 50ng/ml der DIG-markierten cDNA-Sonde (siehe 3.6.2) wie folgt zur Hybridisierungslösung komplettiert:

Die benötigte Sondenmenge wurde in ein 0,5ml-Tube überführt und in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 10min bei 100°C denaturieren. Unmittelbar danach wurde die Sonde für ca. 2min auf Eisalkohol gestellt, kurz kalt abzentrifugiert und komplett in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die rotierende Inkubation im 50°C warmen Hybridisierungssofen wurde über Nacht (insgesamt ca. 16Std) fortgeführt.

3.6.4 Detektion der Hybridisierungssignale

Nach der Hybridisierung wurde der Blot 2x für jeweils 15min in 2x Waschlösung bei Raumtemperatur, 2x für jeweils 15min in 0,5x Waschlösung bei 68°C und danach für 5min in Waschpuffer bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran für 30min bei Raumtemperatur in Blocking-Lösung inkubiert. Diese wurde im Anschluß durch Anti-DIG-Antikörperlösung (1:10.000 in Blockinglösung) ersetzt, in der die rotierende Inkubation für ca. 1std fortgeführt wurde. Es folgten 2 weitere Inkubationen für jeweils 15min bei Raumtemperatur in Waschpuffer und eine weitere 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in Puffer 3, woran sich die Aktivierung der DIG-Fluoreszenz anschloß. Hierzu wurde die RNA-tragende Seite der Membran mit CSPD-Lösung beträufelt und zwischen zwei Folien für 5min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach Ausstreichen der CSPD-Lösung wurde die Membran zwischen den Folien eingeschweißt, für 15min im 37°C warmen Brutschrank inkubiert und letztlich zwischen Verstärkerfolien in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde auf die RNA-tragende Seite des Blots ein Röntgenfilm aufgebracht, für 30sec bis hin zu 10min belichtet und anschließend entwickelt.

3.6.5 Rehybridisierung eines Northern Blots

Nach der Detektion eines mRNA-Moleküls erfolgte stets eine Rehybridisierung desselben RNA-Blots mit einer DIG-markierten GAPDH-cDNA-Sonde (360bp). Bis zum Zeitpunkt der Rehybridisierung wurde der RNA-Blot unmittelbar nach der vorangegangenen Detektion zwischen Folien in 2xSSC-Lösung eingeschweißt und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Durchführung der Rehybridisierung wurde die

Membran in eine Glasschale gelegt und mit 100ml kochend heißer 0,1%iger SDS-Lösung übergossen und in dieser ohne weiteres Erhitzen für 60min auf einem Shaker inkubiert. Nach anschließender 5-minütiger Inkubation in 2xSSC-Lösung erfolgte die Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion analog zu dem zuvor beschriebenen Verfahren (siehe 3.6.3 und 3.6.4).

3.7 Nuclear-Run-On

Mit Hilfe der Nuclear-Run-On-Analyse nach GELLNER *et al.* (1992) sollte die de-novo-Transkription des LOXL4-Gens vergleichsweise in der HNSCC-Zelllinie UT-SCC-19A und in gesunden Keratinocyten des oberen Aerodigestivtraktes nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle galt es, zusätzlich die de-novo-Transkription des GAPDH-Gens in beiden Zelltypen zu bestimmen.

3.7.1 Gewinnung nativer Zellkerne aus adhärenenten Zellkulturen

Es wurden jeweils 4 konfluente Kulturen (75cm²-Kulturflaschen) maligner UT-SCC-19A-Zellen und gesunder epithelialer Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes abgeerntet und durch Zentrifugation pelletiert (siehe 3.1.1). Anschließend wurden die Zellen jeweils in 5ml DMEM resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Ca. 2×10^7 Zellen beider Zelltypen wurden in einem frischen 15ml-Tube durch erneute Zentrifugation bei 800rpm für 5min (Centrifuge 5804 R) pelletiert. Nach Verwerfen der Überstände wurde jedes Pellet in 1ml Dissoziationsmedium resuspendiert, in ein 1,5ml-Tube überführt und mittels Scheren durch eine Insulinspritze homogenisiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 4°C und 100rpm für 5min (Centrifuge 5417 R) wurden größere Zellreste sedimentiert. Die Überstände wurden in frische 1,5ml-Tubes überführt und durch eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 800rpm für 12min (Centrifuge 5417 R) die nativen Zellkerne pelletiert. Die Zellkern-Pellets wurden jeweils in 50µl 2xReaktionspuffer resuspendiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei –80°C eingefroren.

3.7.2 Vorbereitung der Probenmembran

Es wurde jeweils ein Fragment der LOXL4-cDNA (Acc. No. AK025542, Pos. 1268-1907) und der GAPDH-cDNA (Acc. No. BC029618, Pos. 28-387) mit Hilfe spezifischer Primer durch PCR (siehe 3.15) amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare so wie die PCR-Parameter sind im Anhang in Tabelle 9.3.1 aufgeführt. Je 5µg der gereinigten PCR-Produkte (siehe 3.16) wurden mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein 1%iges Agarosegel (siehe 3.4) aufgetragen. Nach einer 90-minütigen Elektrophorese (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) bei einer konstanten Spannung von 80V wurde das Gel mit Hilfe eines UV-Spektrometers optisch kontrolliert und abfotografiert. Anschließend wurde das Gel in 250mM HCl für 10min auf einem Shaker inkubiert und mit Aqua dest. kurz abgespült. Es folgten 2x 15minütige Inkubationen in Denaturierungslösung, erneutes Abspülen mit Aqua dest. und 2x 15minütige Inkubationen in Neutralisierungslösung. Im Anschluß an die verschiedenen Waschschrte wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und die DNA mit Hilfe eines Vakuumbloiters bei 60mbar Unterdruck auf diese übertragen (siehe 3.6.1). Nach 90-minütigem Blotten wurde die Membran kurz in 2xSSC gewaschen, für einige Minuten auf Filterpapier luftgetrocknet, und die DNA im Crosslinker bei 1200µJ auf der Membran fixiert. Die Membran wurde bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.7.3 Run-On-Reaktion

Je ein 50µl-Aliquot nativer Zellkerne aus den malignen und den gesunden Zellen wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1µl 0,1M DTT, je 1µl der 100mM Ribonucleotide ATP, CTP, GTP, 100µCi[α -³²P]UTP und DEPC-H₂O ad 100µl vermischt. Während einer Inkubation von 90min bei Raumtemperatur wurde die Transkription in den Zellkernen durch die dort vorhandenen RNA-Polymerasen fortgeführt und dabei das radioaktive [α -³²P]UTP in die mRNA-Moleküle eingebaut. Nach der Inkubation wurde die RNA aus den Zellkernen beider Zelltypen mit Hilfe

des Trizol-Reagenzes isoliert (siehe 3.2). Die RNA-Pellets wurden jeweils in 200µl DEPC-H₂O inklusive 100U RNase-Inhibitor gelöst.

3.7.4 Hybridisierung nach der Run-On-Reaktion

Die isolierte, radioaktiv markierte Kern-RNA beider Zelltypen wurde gegen jeweils eine Membran mit den darauf immobilisierten cDNA-Fragmenten des LOXL4- und des GAPDH-Gens hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte für 24std bei 42°C in 30% STARKS. Danach wurden die Membranen 2x für 20min bei 37°C in 2xSSC/0,1%SDS gewaschen, in Folie eingeschweißt und in jeweils eine Röntgenfilmkassette zwischen Verstärkerfolien gelegt. In der Dunkelkammer wurde auf die probentragende Seite der Membranen ein Röntgenfilm aufgelegt und nach 4-tägiger Belichtung bei –80°C die Autoradiogramme ausgewertet.

3.8 Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (DDRT-PCR)

3.8.1 Reverse Transkription und Amplifikation mit Hilfe von Zufallsprimern

Mit Hilfe der nach BAUER *et al.* (1993) modifizierten DDRT-PCR-Methode galt es Genexpressionsunterschiede auf mRNA-Level zwischen malignen UT-SCC-19A-Zellen und gesunden Keratinocyten des oberen Aerodigestivtraktes nachzuweisen. Als Ausgangsmaterial für die DDRT-PCR diente RNA, die aus den zu vergleichenden Zelltypen isoliert wurde (siehe 3.2). Diese wurde einer reversen Transkription unterzogen, die im Wesentlichen nach dem in 3.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt wurde, jedoch wurde anstatt eines Oligo-dT₁₂-Primers ein Ankerprimer mit der Sequenz 5'-dT₁₁CG-3' verwendet.

Die von beiden Zelltypen erstellten cDNA-Populationen wurden anschließend in einer PCR als Template eingesetzt. Dazu wurden 2µl cDNA eines Zelltyps, 1,5mM MgCl₂, 2µl 10xPCR-Puffer, 4µM dNTP's, 60mCi [α ³²P]-ATP, 0,2µM eines von 26 möglichen Dekamer-Primern, in diesem Falle des U12-Primers mit der Sequenz 5'-

CTGCTTGATG-3', 1µM des D2-Ankerprimers, 2,5 U *Taq*-Polymerase und doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) ad 20µl zusammenpipettiert. Die Ansätze wurde in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600: Perkin Elmer; Norwalk, USA) folgenden Inkubationsschritten unterzogen: 94°C für 30sec zur Denaturierung der DNA, 40°C für 2min zwecks Primer-Annealing und 72°C für 15sec zur Extension der DNA zu kompletten Doppelsträngen. Dieser 3-Schritt-Zyklus wurde 39-mal wiederholt. Abschließend wurde eine 5-minütiger Extensionsschritt bei 72°C vorgenommen. Die fertigen PCR-Produkte wurden bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.8.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Autoradiographie

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 0,8mm dickes Sequenziergel bestehend aus TBE-Puffer mit 12,5% Rotiphorese NF Acrylamid/Bis-Lösung (Roth; Karlsruhe, Germany), 0,42g/ml Harnstoff und den Polymerisationskatalysatoren Ammoniumpersulfat (APS; 0,25mg/ml) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED; 0,0125% (v/v)) hergestellt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Two Step Direct Blotter: Hoefer; San Francisco, USA) eingesetzt.

Die PCR-Proben wurden mit jeweils 11µl DD-Ladepuffer vermischt, anschließend für 2min bei 100°C in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) denaturiert und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Je 2x5µl der vorbereiteten Proben wurden in nebeneinanderliegende Geltaschen appliziert. Danach erfolgte eine 100-minütige Elektrophorese bei einer konstanten Leistung von 40W. Nach ihrer Beendigung wurde das Gel blasenfrei auf Filterpapier transferiert, ebenfalls blasenfrei mit einer Zellophan-Folie abgedeckt und für 90min bei 74°C in einem Geltrockner getrocknet. Anschließend wurde das Gel mit einer Belichtungszeit von ca. 24std autoradiographiert.

3.8.3 Isolierung differentiell exprimierter Genfragmente

Zur Isolierung einer differentiell exprimierten Bande von Interesse wurde der entwickelte Röntgenfilm passgenau auf das getrocknete Polyacrylamid-Gel gelegt und die Bande mit einer Nadel auf dem Film umstochen, so dass die Stichstellen sich auf dem darunter befindlichen Gel abzeichneten. Die Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, der Gel-/Filterpapierstreifen in ein 0,5ml-Tube überführt und für 10min in 100µl ddH₂O bei Raumtemperatur eingeweicht. Anschließend wurde die Gelbande im Thermocycler (DNA Thermocycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 15min bei 100°C von dem Filterpapier heruntergeschmolzen. Die Gel-Lösung wurde in ein frisches 1,5ml-Tube überführt und zur Fällung der cDNA mit 10µl einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH 4,7) und 450µl absolutem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde für 1std bei –80°C inkubiert und danach bei 4°C und 14000rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das cDNA-Pellet mit 200µl 75%igem Ethanol gewaschen und erneut für 1min bei 14000rpm und 4°C abzentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen und anschließend das cDNA-Pellet im geöffneten Tube durch Inkubation bei Raumtemperatur für 3min getrocknet. Letztlich wurde die cDNA in 12µl ddH₂O gelöst und in einer nachfolgenden PCR als Template eingesetzt.

3.8.4 Reamplifikation differentiell exprimierter Genfragmente

Nach seiner Isolierung wurde das differentiell exprimierte Genfragment in einer erneuten PCR reamplifiziert. Dazu wurden 4µl der cDNA mit 1,5mM MgCl₂, 20mM dNTP's, 4µl 10xPCR-Puffer, 2,5U *Taq*-Polymerase, 1µM des bereits in der RT verwendeten D2-Ankerprimers (siehe 3.8.1), 0,2mM des in der vorangegangenen PCR verwendeten U12-Primers (siehe 3.8.1) und ddH₂O ad 40µl zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600: Perkin Elmer; Norwalk, USA) einer PCR unterzogen, deren Parameter der ersten PCR (siehe 1.7.2) glichen. Anschließend wurden 4µl des PCR-Produktes mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (DNA Molecular Weight Marker V: Roche) auf ein 1%iges

Agarosegel (siehe 3.4) aufgetragen. Nach einer 90-minütigen Elektrophorese (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) bei einer konstanten Spannung von 80V wurde das Gel in einem UV-Spektrometer optisch ausgewertet. Restliche cDNA sowie restliches PCR-Produkt wurden in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

3.9 Klonierung von PCR-Produkten

3.9.1 Klonierungs-Reaktion

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte nach dem von SHUMAN (1994) modifizierten Prinzip der TA-Klonierung unter Verwendung des „TOPO TA Cloning Kits“ (Invitrogen; Karlsruhe, Germany). Den Angaben des Herstellers folgend wurde zunächst ein Ligationsansatz bestehend aus 1-4 μl des PCR-Produktes (entsprechend ca. 30ng), 10ng des pCR-2.1-TOPO-Vectors (Invitrogen), 1 μl Salt Solution (1,2M NaCl, 0,06M MgCl_2) und ddH₂O ad 6 μl in einem 0,5ml-Tube zusammenpipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 μl des Ligationsansatzes in ein Tube mit chemisch kompetent gemachten *E.coli*-Bakterien (TOP10 Cells: Invitrogen) gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30sec einem Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad ausgesetzt und unmittelbar danach wieder auf Eis gestellt. Nach Zufügen von 250 μl SOC-Medium wurden die Bakterien im leicht schüttelnden Wasserbad bei 37°C für 1std inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde eine Ampicillin enthaltende LB-Agarplatte (100 $\mu\text{g/ml}$) mit jeweils 40 μl X-Gal (40mg/ml) und IPTG (100mM) gleichmäßig bestrichen und im Brutschrank bei 37°C vorgewärmt. Nach ihrer Inkubation wurden 100 μl der Bakteriensuspension auf der warmen Agarplatte gleichmäßig mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen, und die Platte umgedreht im Brutschrank bei 37°C über Nacht bebrütet. Am folgenden Tag wurden lediglich weiße Kolonien (Blau-weiß-Selektionierung nach ULMANN *et al.*, 1970) mit Hilfe einer 100 μl -Eppendorfpipette mit sterilen Spitzen gepickt und jeweils in ein 15ml-Tube mit 10ml LB-Medium inklusive Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) überimpft. Die Tubes wurden in einem rotierenden Hybridisierungssofen bei 37°C erneut über Nacht

inkubiert. Anschließend wurde von jedem herangezuchteten Bakterienklon eine Referenzprobe bestehend aus 1ml Bakteriensuspension und 100µl Glycerol in einem 1,5ml-Tube bei -80°C eingefroren. Die restliche Bakteriensuspension wurde bei 5000rpm für 25min abzentrifugiert (Centrifuge 5804 R), der Überstand verworfen, und die verbliebenen Bakterienpellets einer Plasmidisolierung unterzogen.

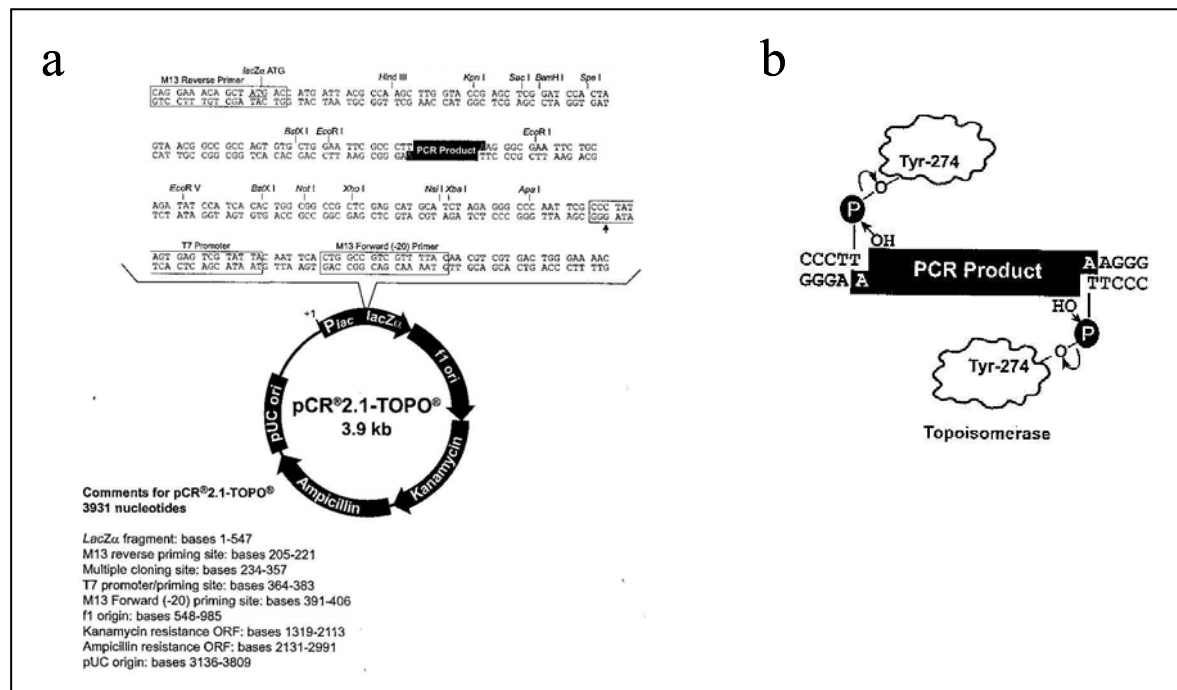


Abb. 3.1: TA-Klonierung.

a) Karte und Cloning-Site des pCR 2.1-TOPO-Vektors (Invitrogen). b) Prinzip der TA-Klonierung mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kits (Invitrogen). Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus bindet sequenzspezifisch an die doppelsträngige DNA und schneidet dort einen Einzelstrang hinter der Sequenz 5'-CCCTT-3'. Die dabei frei werdende Energie wird durch die kovalente Bindung des freigewordenen 3'-Phosphatrestes des geschnittenen DNA-Einzelstrangs an einen Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Die Phospho-Tyrosyl-Bindung zwischen DNA und Enzym kann durch die 5'-Hydroxyl-Gruppe des ursprünglich geschnittenen DNA-Strangs angegriffen und rückgängig gemacht werden, wodurch die Topoisomerase I wieder frei wird (SHUMAN, 1994).

3.9.2 Plasmidisolierung aus Bakterienklonen

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienklonen erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach BIRNBOIM *et al.* (1979) unter Verwendung des „GFX Plasmid Mini Prep Kits“ (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers.

Hierzu wurden die durch Zentrifugation erhaltenen Bakterienpellets aus einer 10ml-Über-Nacht-Kultur (siehe 3.9.1) in einem RNase-haltigen alkalischen Lysepuffer durch Vortexen lysiert. Anschließend erfolgte eine Neutralisierung der Lösungen

sowie eine Fällung der bakteriellen Proteine, die mittels Zentrifugation der Proben bei 14000rpm für 5min bei Raumtemperatur sedimentiert wurden. Die plasmidhaltigen Überstände wurden jeweils auf eine Säule mit einer Glasfasermatrix (GFX-Columns: Amersham Pharmacia) aufgetragen, an die die DNA in Gegenwart chaotroper Salze band. Nach Waschen mit einem Ethanol-haltigen Puffer wurde die Plasmid-DNA mit jeweils 50µl ddH₂O von der Säulenmatrix eluiert.

3.9.3 Überprüfung der DNA-Inserts durch Restriktionsverdau

Die im pCR-2.1-TOPO-Vektor klonierten DNA-Inserts wurden nach der Plasmidisolierung mit Hilfe der Restriktionsendonuclease *EcoR* I wieder aus dem Vektor herausgeschnitten. Für diesen Verdau wurden in einem 0,5ml-Tube 1µg Plasmid-DNA, 4U *EcoRI* (Roche), 10xRestriktionspuffer B (Endkonz. 1x) und 0,01% BSA zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) für 2std bei 37°C und anschließend für 5min bei 65°C inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proben mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt, zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein 1%iges Agarosegel (siehe 3.4) aufgetragen und einer 90-minütigen Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 80V (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) unterzogen. Anschließend wurde das Gel in einem UV-Spektrometer optisch ausgewertet und die Größe der Inserts anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt.

3.10 Sequenzierung von DNA-Fragmente

3.10.1 Cycle-Sequencing

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach SANGER *et al.* (1977) mit Hilfe des „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits“ (Applied Biosystems). Nach Angaben des Herstellers wurde ein Reaktionsansatz aus 1µg Insert-tragendem Plasmid, 8µl Big Dye Premix (Applied Biosystems), 1µl DMSO, 1µl 10µM M13-

reverse- oder M13(-20)-forward-Primer und ddH₂O ad 20µl in einem 200µl-Tube zusammenpipettiert. Anschließend wurde der Ansatz in einem Thermocycler (Gene Amp PCR System 9600: Perkin Elmer; Norwalk, USA) einer Cycle-Sequencing-Reaktion unterzogen, bei der er mit 24 Wiederholungen zunächst auf 96°C für 10sec, danach auf 59°C für 5sec und schließlich auf 60°C für 4min erhitzt wurde. Durch die 4 verschiedenen im BigDye-Premix enthaltenen Didesoxynucleotide, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, wurden die DNA-Inserts während des Cycle Sequencing nach SANGER *et al.* (1977) unvollständig amplifiziert und gleichzeitig markiert. Nach Präzipitation (siehe 3.10.2) wurden die markierten DNA-Fragmente im ABIPrism TM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer; Norwalk, USA) sequenziert.

3.10.2 Ethanolfällung von DNA-Proben

Die Präzipitation von DNA erfolgte mittels Ethanol-Fällung. Der zu fällenden DNA-Probe wurden 2µl einer 3mM Natriumacetat-Lösung (pH 4,7), 55µl absolutes Ethanol und 1µl Dextranblau-Lösung (20µg/µl) zugefügt. Das Gemisch wurde in ein 0,5ml-Tube überführt, für 15min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das blaue DNA-Pellet wurde anschließend in 250µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 14000rpm für 5min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das DNA-Pellet im offenen Tube für ca. 20min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden der DNA 25µl TSR-Puffer (Template Suppression Reagent; Applied Biosystems) zugefügt, in dem sie nach Erwärmen auf 70°C für 2min im Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer; Norwalk, USA) resuspendiert wurde. Danach schloß sich eine 2-minütige Denaturierung bei 95°C an, nach der die Probe unmittelbar für ca. 2min auf Eis gestellt wurde. Nach kurzer Zentrifugation bei 14000rpm wurden die Proben wie in 3.10.1 beschrieben sequenziert.

3.11 Datenbankanalyse

Zwecks Identifizierung wurden DNA-Fragmente nach ihrer Sequenzierung einem Homologievergleich mit den in der Genbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen (NCBI; Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) gespeicherten Sequenzen bekannter Gene unterzogen.

3.12 5'RACE-PCR

Die 5'RACE-Technik (Rapid Amplification of cDNA Ends) wurde in einer modifizierten Form nach FROHMAN (1994) unter Verwendung des „Advantage 2 PCR Kits“ und des „SMART RACE cDNA Amplification Kit“ (beides BD Clontech; Heidelberg) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente mRNA aus der Tumorzelllinie UT-SCC-19A. Nach Angaben des Herstellers wurde 1µg mRNA mit 1µl 5'CDS-Primer (10µM: 5'-(T)₂₅N₁N-3'; N=A,C,G oder T; N₁=A,G oder C), 1µl SMART II Oligo (10µM: 5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3') und sterilem ddH₂O ad 5µl zusammenpipettiert, gevortext und kurz bei 14000rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2min bei 70°C im Thermocycler (DNA Thermalcycler 480: Perkin Elmer) inkubiert und unmittelbar danach für 2min auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation bei 14000rpm wurden 2µl 5xFirst-Strand-Buffer, 1µl DTT (20mM), 1µl dNTPs (je 10mM) und 1µl SuperscriptII (MMLV-Reverse Transcriptase) zugefügt und der komplette Ansatz für 90min in einem 42°C warmen Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl Tricine-EDTA-Puffer und eine Inkubation bei 72°C für 7min im Thermocycler. Die fertige 5'RACE-Ready-cDNA wurde in einer anschließenden PCR als Template eingesetzt. Hierzu wurde zunächst ein Master Mix bestehend aus 34,5µl PCR-Grade-Water (Clontech), 5µl 10xAdvantage 2 PCR-Puffer (Clontech), 1µl dNTP's (je 10mM) und 1µl 50xAdvantage 2 Polymerase-Mix (Clontech) hergestellt. In der genannten Reihenfolge wurden anschließend 2,5µl der 5'RACE-Ready-cDNA, 5µl 10xUPM (Universal Primer Mix; Clontech), 1µl eines genspezifischen Primers (GSP; 10µM: 5'-GTCTGGTGCAGTGTCCATG-3') und der komplette Master Mix auf Eis zusammenpipettiert. Der komplette 5'PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50µl) wurde in

einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9600: Perkin Elmer) folgenden Inkubationsschritten unterzogen: 5 Wiederholungen eines 2-Schritt-Zyklus von 94°C für 5sec und 72°C für 3min; 5 Wiederholungen eines 3-Schritt-Zyklus bei 94°C für 5sec, 70°C für 10sec und 72°C für 3min; 30 Wiederholungen eines 3-Schritt-Zyklus bei 94°C für 5sec, 68°C für 10sec und 72°C für 3min.

Im Anschluß an die PCR wurden 5µl des 5'RACE-PCR-Produkts mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein 1,2%iges Agarosegel (siehe 3.4) aufgetragen. Nach einer 90-minütigen Elektrophorese (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) bei einer konstanten Spannung von 80V wurde das 5'RACE-PCR-Produkt in einem UV-Spektrometer optisch überprüft und seine Größe anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt. Von dem restlichen 5'-RACE-Produkt wurden 4µl in einer TA-Klonierung (siehe 3.9) eingesetzt und das klonierte DNA-Fragment sequenziert (siehe 3.10).

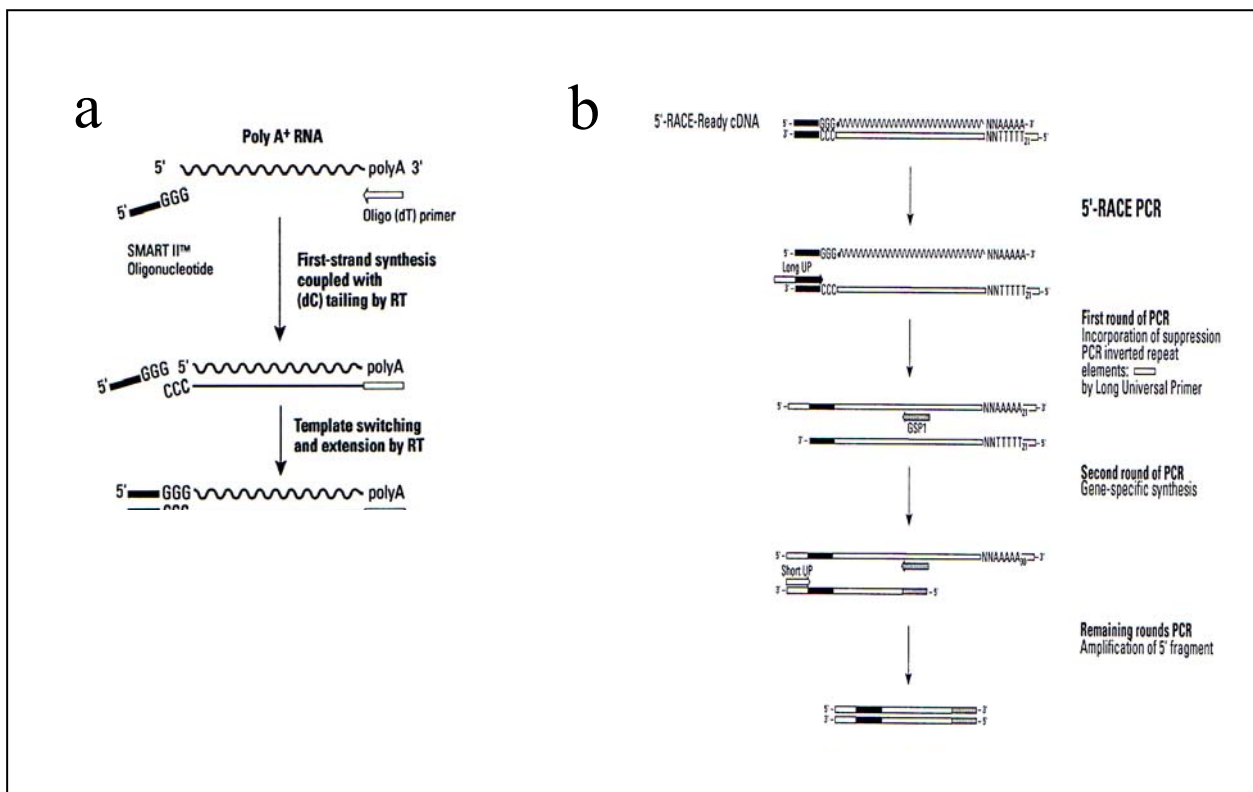


Abb. 3.2: 5'RACE-PCR.

a) Herstellung der 5'RACE-Ready-cDNA. b) Amplifikation der 5'RACE-Ready-cDNA. (Die Abbildungen stammen aus dem Manual des „SMART RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech. Die Beschreibung der Reaktionsabläufe ist obigem Text zu entnehmen.)

3.13 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus adhärent wachsenden Zellkulturen wurde der „E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II“ (Peglab Biotechnologie GmbH; Hamburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Vorgang entsprach einer modifizierten Methode nach BLIN und STAFFORD (1976).

Die adhärenenten Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA-Lösung abgeerntet und durch Zentrifugation pelletiert (siehe 3.1.1). Maximal 1×10^7 Zellen wurden in 800µl eines dem Kit beigefügten Lysepuffers resuspendiert, in ein 1,5ml-Tube überführt und nach Zugabe von 25µl Protease-Lösung gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Schüttelwasserbad bei 55°C für 1std. Die in der Probe befindliche RNA wurde danach durch Zugabe von 50µl RNase-A-Lösung (10mg/ml) und Inkubation für 2min bei Raumtemperatur abgedaut. Im nächsten Schritt wurde das Zellysat nach Zugabe von 880µl BL-Puffer sorgfältig durch Vortexen vermischt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes im Wasserbad bei 70°C für 10min. Danach wurden dem Lysat 880µl absolutes Ethanol zugesetzt, und es wurde erneut gevortext. In den folgenden Arbeitsschritten erfolgte dann die eigentliche Isolierung der genomischen DNA. Hierzu wurde eine HiBind-DNA-Säule in einem 2ml-Sammeltube mit ca. 800µl des Ansatzes beladen. Nach Zentrifugation bei 8000xg für 1min wurde das Sammel tube mit dem darin befindlichen Säulendurchfluß verworfen, dieselbe Säule in ein frisches Sammel tube überführt und erneut mit dem Ansatz beladen. Diese Prozedur wurde so oft wiederholt bis der gesamte Ansatz durch die Säule gelaufen war. Es folgten zwei identische Waschschr itte, bei denen die Säule erneut in ein frisches Sammel tube überführt und nach Beladen mit 750µl DNA-Waschpuffer für 1min bei 8000xg zentrifugiert wurde. Im darauf folgenden Trocknungsschritt wurde dieselbe Säule in einem frischen Sammel tube für 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Für die abschließende Elution der genomischen DNA aus der Säulenmatrix wurde die Säule in ein frisches 1,5ml-Tube überführt und mit 200µl 70°C-warmen Elutionspuffer beladen. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 3min wurde die Säule im Tube für 1min bei 8000xg zentrifugiert. Dieser letzte Elutionsschritt konnte entweder mit frischem oder mit dem bereits durchgelaufenen Elutionspuffer wiederholt werden. Mit diesem Verfahren konnten aus einer Menge von 1×10^7 Zellen ca. 8-30µg genomische DNA isoliert werden.

3.14 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA oder cDNA erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie es unter 3.3 für RNA beschrieben wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte in diesem Falle jedoch gegenüber einem Leerwert aus destilliertem Wasser, und der Umrechnungsfaktor f betrug $0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.15 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Amplifikationen und Reamplifikationen bestimmter DNA-Abschnitte erfolgten mittels Polymerase Chain Reaction (PCR). Dazu wurde jeweils ein Ansatz von $50\mu\text{l}$ Gesamtvolumen bestehend aus $5\mu\text{l}$ 10xPCR-Puffer (Qiagen), $10\mu\text{l}$ 5xQ-Solution (Qiagen), $1\mu\text{l}$ 10mM dNTP's, je $1\mu\text{l}$ sequenzspezifischen Sense- und Antisense-Primer (beide $10\mu\text{M}$), 2,5U *Taq*-Polymerase und einer variablen Menge DNA-Template in einem $0,5\text{ml}$ -Tube zusammenpipettiert. Bei Verwendung von cDNA als Template wurden 500ng pro Reaktion eingesetzt, von genomischer DNA 300ng und im Falle einer Reamplifikation $1\mu\text{l}$ des zuvor generierten PCR-Produktes. Die Ansätze wurden in einem Thermocycler (T3 Thermocycler: Biometra; Göttingen) verschiedenen Inkubationsschritten, abhängig vom jeweiligen PCR-Produkt, unterzogen. Prinzipiell wurden sie zunächst zwecks Denaturierung der DNA für 4min auf 94°C erhitzt. Daran schloß sich ein 3-Stufen-Zyklus mit mehreren Wiederholungen an, bestehend aus einer Inkubation bei 94°C für 45sec zur Denaturierung der DNA, einer Inkubation bei der jeweiligen Annealingtemperatur der Primer, damit diese sich sequenzspezifisch an die DNA anlagern können, und einer Inkubation bei 72°C zur Synthese neuer DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase. Abschließend folgte ein 5minütiger Extensionsschritt bei 72°C , um die Herstellung doppelsträngiger DNA sicherzustellen. Im Anschluß an die PCR wurden die Proben mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker auf ein 1,2%iges Agarose-Gel (siehe 3.4) aufgetragen. Nach einer 90-minütigen Elektrophorese (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System: Life Technologies; Gaithersburg, USA) bei einer konstanten Spannung von 80V wurde das Gel optisch mit Hilfe eines UV-Spektrometers

ausgewertet und die Größe der PCR-Produkte anhand des Molekulargewichtsmarkers kontrolliert.

Alle in dieser Arbeit generierten PCR-Produkte sind unter Angabe ihrer Bezeichnung, Größe, Primer-Sequenzen und PCR-Parameter im Anhang in Tabelle 9.3.1 aufgeführt.

3.16 Isolierung von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Die Isolierung von DNA-Banden aus einem Agarosegel erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach VOGELSTEIN *et al.* (1979) und MARKO *et al.* (1982) unter Verwendung des „GFX Gel Band and Purification Kit“ (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Das Agarosegel wurde auf einen UV-Tisch gelegt, die DNA-Bande von Interesse mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten, in ein 1,5ml-Tube überführt und gewogen. Pro 10mg Gewicht wurden dem Gelstück 10µl eines Acetat- und Chaotrop-haltigen Puffers zugefügt, die Probe gevortext und in einem 60°C warmen Schüttelwasserbad ca. 20min bis zum vollständigen Schmelzen des Gels inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 14000rpm wurde die DNA-Lösung auf eine Säule mit Glasfasermatrix (GFX-Column: Amersham Pharmacia) aufgetragen, an die die DNA in Gegenwart der chaotropen Salze band. Nach einem Waschschrift mit Ethanol-haltigem Puffer wurde die DNA mit 50µl ddH₂O von der Säule eluiert.

3.17 Analyse der regulatorischen Region des LOXL4-Gens

3.17.1 Nachweis potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

In der regulatorischen Region des LOXL4-Gens von Pos. +29 bis –348 wurden mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector V2.2“ potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren ermittelt.

3.17.2 Herstellung von Reportergenkonstrukten

Die regulatorische Region des LOXL4-Gens von Pos. +15 bis –348 sollte in 9 aufeinanderfolgende Fragmente von 34-58bp Länge unterteilt werden, die es später einzeln in den pGL3-Enhancer-Vektor (Promega) zu integrieren galt. Aus diesem Grund mussten Fragmente und Vektor zunächst mit komplementären Enden versehen werden.

Die DNA-Fragmente wurden durch Annealing synthetisch hergestellter, einzelsträngiger (single-stranded=ss) Oligonucleotide erzeugt. Ihre Sequenzen waren von vorn herein derart gewählt worden, dass die resultierenden Doppelstränge an den Enden bereits geschnittene Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II (am 5'-Ende) und *Hind*III (am 3'-Ende) trugen. Für das Annealing wurden jeweils 100pmol zweier komplementärer Einzelstränge in einem 0,5ml-Tube zusammenpipettiert und in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer) für 10min auf 100°C erhitzt. Danach wurden die Proben in dem sich langsam abkühlenden Cycler belassen, bis sie Raumtemperatur erreicht hatten.

Der pGL3-Enhancer-Vektor wurde vor Integration der DNA-Fragmente einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen unterzogen. Dazu wurde 1µg des Plasmids mit jeweils 4U der Enzyme *Bgl*II und *Hind*III, 10xInkubationspuffer B (Endkonz. 1x) und 0,01% BSA in einem 0,5ml-Tube zusammenpipettiert und in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480: Perkin Elmer) für 2Std bei 37°C (Restriktionsverdau) und anschließend für 5min bei 65°C (Inaktivierung der Restriktionsenzyme) inkubiert.

Für die Ligation wurden 200ng des geschnittenen Plasmidvektors und jeweils eines der zu testenden Promotor-Fragmente im molaren Verhältnis 1:5 in einem 0,5ml-Tube vermischt. Die Ansätze wurden durch Zugabe von 1U T4-Ligase und 10xLigationspuffer (Endkonz. 1x) komplettiert und für 16std bei 4°C inkubiert. Um die Ligation zu überprüfen, wurden nach Ablauf der Inkubationszeit 30ng Gesamt-DNA jedes Ligationsansatzes in chemisch kompetenten *E.Coli*-Bakterien (TOP10-Cells: Invitrogen; Karlsruhe, Germany) kloniert (siehe 3.9) und die Klone anschließend sequenziert (siehe 3.10). Die eingefrorenen Referenzproben der korrekten Bakterienklone dienten als Reservoir für die Gewinnung der Reportergenkonstrukte.

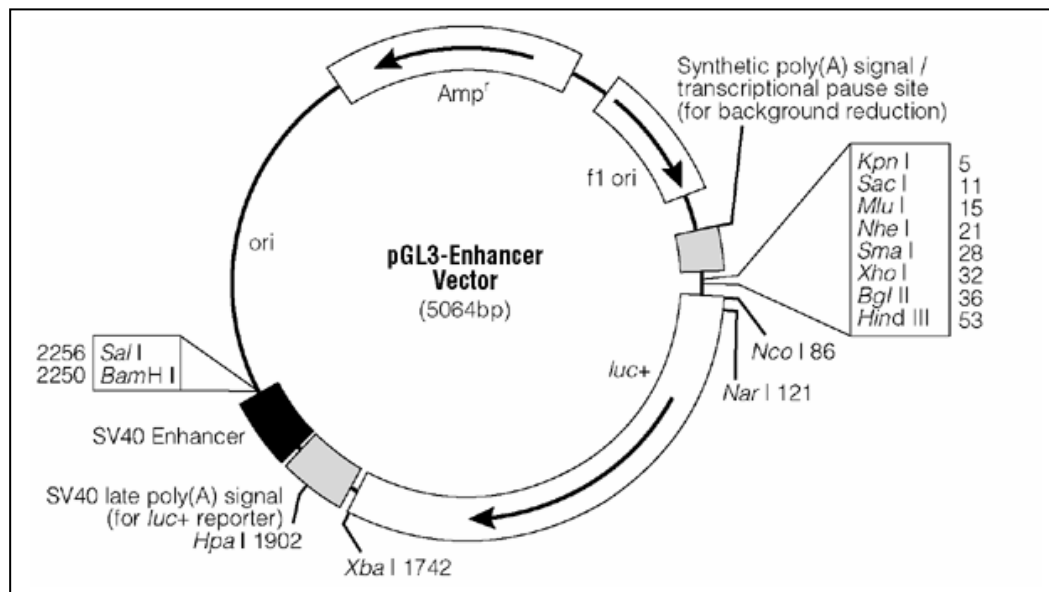


Abb. 3.3: Karte und Multiple-Cloning-Site des pGL3-Enhancer-Vektors (Promega).

3.17.3 Transiente Transfektion mit Reportergenkonstrukten

Zwecks vergleichender Untersuchungen wurden die 9 zuvor hergestellten Reportergenkonstrukte in Kulturen der Larynxkarzinomzelllinie UT-SCC-19A und gesunder Epithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes transient transfiziert.

Hierzu wurden beide Zelltypen zunächst mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well auf 6-Well-Plates ausgesät. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert und dann die Transfektion durchgeführt: Für die Transfektion eines Wells wurde ein Reportergenkonstrukt mit dem pRL-TK-Vector (Promega), der der Überprüfung der Transfektionseffizienz diente, im Verhältnis 30:1 und mit einer Gesamt-DNA-Menge von $1 \mu\text{g}$ in einem 1,5ml-Tube vermischt, dem anschließend $100 \mu\text{l}$ KGM-Medium zugefügt wurden. In einem weiteren 1,5ml-Tube wurden $15 \mu\text{l}$ Lipofectin-Reagenz (Invitrogen) mit $100 \mu\text{l}$ KGM-Medium verdünnt. Beide Ansätze wurden für 35min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend miteinander vermischt und für weitere 15min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die zu transfizierenden Zellen wurden mit KGM-Medium gewaschen und mit $0,8 \text{ ml}$ KGM-Medium als Kulturmedium überschichtet. Anschließend wurde das fertige Transfektionsgemisch (ca. $217 \mu\text{l}$) zu den Zellen getropft und diese danach im Brutschrank weiterkultiviert.

Etwa 24std nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen für weitere 24std kultiviert.

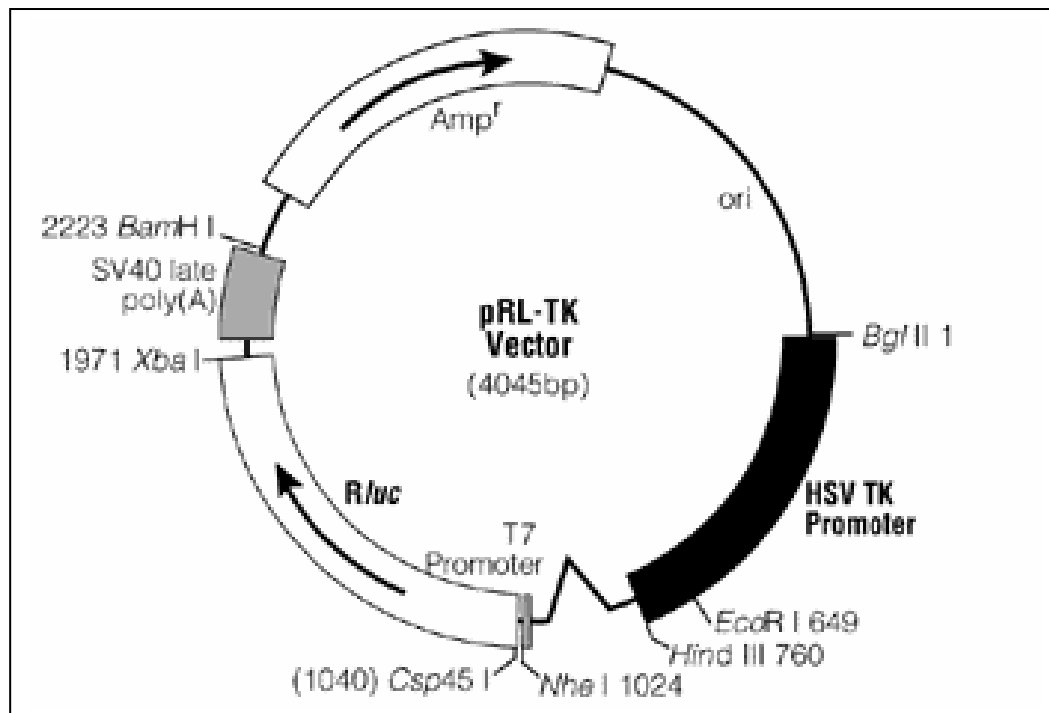


Abb. 3.4: Karte des pRL-TK-Vektors (Promega).

3.17.4 Dual-Luciferase-Assay (DLA)

Etwa 48std nach ihrer Transfektion wurden die Zellen einem Dual-Luciferase-Assay (DLA) unterzogen, das mit Hilfe des „Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Kits“ (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Diese Methode erlaubte die nahezu gleichzeitige Quantifizierung der in den transfizierten Zellen exprimierten Firefly Luciferase und Renilla Luciferase mit Hilfe eines Luminometers (Lumat 19057; Berthold). Für die Durchführung des DLA wurden die transfizierten Zellen zunächst mit 1xPBS gewaschen und anschließend für 30min mit einem Lysepuffer (500µl pro Well) auf einem Shaker bei Raumtemperatur lysiert. Jedes Lysat wurde in einem 1,5ml-Tube gesammelt und folgendermaßen der Quantifizierung der beiden Luciferasen im Luminometer unterzogen: Jeweils 20 µl eines Zelllysats wurden mit 100µl LARII-Puffer (Promega) in einem Luminometerröhrchen vermischt. Die dadurch aktivierte Lumineszenz der Firefly Luciferase wurde unmittelbar im Luminometer in einem Messintervall von 10sec in Form von Relative Light Units (RLU) quantifiziert. Derselben Probe wurden

anschließend 100µl Stop-and-Glo-Puffer (Promega) zugefügt, was die Lumineszenz der Firefly Luciferase hemmte und gleichzeitig die der Renilla Luciferase aktivierte. Es erfolgte ebenfalls unmittelbar die Quantifizierung der Renilla Luciferase im Luminometer in einem Messintervall von 10sec in Form von RLU, womit das DLA abgeschlossen war. Die RLU-Werte für beide Luciferasen (RLU_{FL} und RLU_{RL}) wurden von dem Luminometer automatisch protokolliert.

Von jedem Reportergenkonstrukt wurden 3 Transfektionsansätze pro Zelltyp erstellt und 48std nach der Transfektion auf die beschriebene Weise einem DLA unterzogen.

3.17.5 Berechnung vergleichbarer DLA-Meßwerte

Zunächst wurden in beiden Zelltypen die Nullwerte für die Firefly und die Renilla Luciferase bestimmt. Hierzu wurden jeweils 3 DLA-Messungen pro Zelltyp vorgenommen, die mit einem „leeren“, d.h. keinem Insert enthaltenden pGL3-Enhancer-Vektor und dem pRL-TK-Vektor im Verhältnis 30:1 co-transfiziert worden waren. Aus den 3 pro Zelltyp erhaltenen Messwerten für RLU_{FL} wurde der Mittelwert RLU_{FL} -null gebildet. Entsprechend wurde mit den Werten für RLU_{RL} verfahren.

Von jedem Reportergenkonstrukt wurden 3 Transfektionsansätze pro Zelltyp erstellt und 48std nach der Transfektion auf die beschriebene Weise einem DLA unterzogen. Von den 3 Wertepaaren RLU_{FL} und RLU_{RL} wurden anschließend die für den jeweiligen Zelltyp entsprechenden Nullwerte RLU_{FL} -null und RLU_{RL} -null subtrahiert. Aus den 3 „bereinigten“ Werte-Paaren wurden anschließend die 3 entsprechenden Quotienten RLU_{FL}/RLU_{RL} berechnet, aus denen erneut ein Mittelwert gebildet wurde, der den Endwert der DLA-Messung für das jeweilige Reportergenkonstrukt darstellte. Die Endwerte gleicher Reportergenkonstrukte, die in die beiden unterschiedlichen Zelltypen transfiziert worden waren, wurden in einem Excel-Diagramm vergleichend dargestellt (siehe Kapitel „Ergebnisse“ 4.11.3).

3.17.6 Herstellung von Reportergenkonstrukten mit zusammenhängenden Promotorabschnitten

Die 9 zuvor untersuchten Promotorabschnitte des LOXL4-Gens galt es nun zusammenhängend, d.h. stets von der Transkriptions-Initiationsstelle ausgehend in den pGL3-Enhancer-Vector (Promega) zu integrieren. Insgesamt wurden 7 Reportergenkonstrukte mit folgenden Inserts hergestellt: REP 1-2, REP 1-3,, REP 1-7 und REP 1-9.

Die Inserts wurden zunächst in einer Standard-PCR (siehe 3.15) mit Hilfe von flankierten Primern (forward-Primer flankiert mit Schnittstelle für *Bgl*II; reverse-Primer flankiert mit Schnittstelle für *Hind*III) amplifiziert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die jeweiligen PCR-Parameter sind im Anhang in Tabelle 9.3.1 aufgeführt. Nach einem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen wurden die Inserts in den gleichermaßen geschnittenen Vektor ligiert (siehe 3.17.2). Die fertigen Reportergenkonstrukte wurden wie zuvor beschrieben (siehe 3.17.3) in beide Zelltypen transfiziert und anschließend einem DLA unterzogen (siehe 3.17.4). Jedes Konstrukt wurde 3-mal pro Zelltyp transfiziert, im DLA gemessen und der entsprechende Endwert berechnet (siehe 3.17.5).

3.18 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mit Hilfe der EMSA-Technik wurden die gleichen einzelnen DNA-Fragmente aus dem regulatorischen Bereich des LOXL4-Gens untersucht, die bereits zuvor in Reportergenkonstrukten analysiert worden waren (siehe 3.17.2). Um differentiell bindende Transkriptionsfaktoren nachzuweisen zu können, wurde jeder Abschnitt vergleichend für maligne UT-SCC-19A-Zellen und gesunde epitheliale Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes untersucht.

3.18.1 Isolierung von Zellkernproteinen

Jeweils 2 konfluente Kulturflaschen (75cm²) maligner UT-SCC-19A-Zellen und gesunder Epithelzellen der Nasenschleimhaut wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung abgeerntet und anschließend abzentrifugiert (siehe 3.1). Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren in jeweils 1ml PBS wurden die Zellsuspensionen in frische 1,5ml-Tubes überführt und bei 1000rpm und 4°C für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und die Zellpellets in je 100µl Sucrose Buffer inklusive 0,5% Nonidet-NP40 (v/v) vorsichtig resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 500rpm und 4°C für 5min und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellkernpellet in 100µl Sucrose Buffer ohne Nonidet NP-40 resuspendiert. Daran schloß sich eine 5minütige Zentrifugation bei 500rpm und 4°C an, wonach der Überstand wiederum verworfen wurde. Das Zellkernpellet wurde im Anschluß in 100µl Low Salt Buffer resuspendiert, danach wurden tropfenweise 100µl High Salt Buffer zugefügt und alles durch vorsichtiges Auf- und Abziehen mit der Pipette vermischt. Es erfolgte eine Inkubation der Proben bei 4°C für 45min, wobei in 10minütigen Abständen eine Durchmischung der Proben durch Invertieren der Tubes vorgenommen wurde. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 14.000rpm und 4°C für 15min zentrifugiert. Die überstehenden Zellkernextrakte wurden in frische 1,5ml Tubes überführt und mit 40mM Protease-Inhibitor (Roche) versetzt. Nach Bestimmung des Proteingehaltes nach BRADFORD (1976) im UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595nm wurden die Zellkernextrakte in 10µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.18.2 Markierung der Oligonucleotide mit [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP

Die zu untersuchenden doppelsträngigen DNA-Fragmente (Oligonucleotide) wurden unter Verwendung des Enzyms T4-Polynucleotidkinase einem Endlabelling mit radioaktiven [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP unterzogen. Dazu wurden 50ng eines Oligonucleotids in Gegenwart von 1xPolynucleotidkinase-Reaktionspuffer, 1µl Polynucleotidkinase, 2µl [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP (entsprechend 20µCi) und Aqua bidest ad 10µl für 10min bei 37°C inkubiert und die Markierungsreaktion anschließend durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA-Lösung (pH 8,0) gestoppt.

3.18.3 EMSA

Für jedes zu untersuchende Oligonucleotid wurden 3 unterschiedliche Reaktionsansätze auf Eis zusammenpipettiert. Ansatz 1 enthielt 1µl Poly(dI-dC) (0,5µg/µl in TE-Puffer), 2µl 5xBinding Buffer, 1µg Zellkernproteine aus UT-SCC-19A-Zellen und Aqua bidest ad 9µl. Ansatz 2 wurde analog mit Zellkernproteinen aus gesunden epithelialen Schleimhautzellen hergestellt und Ansatz 3 analog als Negativkontrolle ohne Zellkernproteine. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde allen 3 Ansätzen je 1µl desselben mit [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP markierten Oligonucleotids (entsprechend 5ng) zugefügt und die Inkubation für 20min fortgesetzt. Anschließend wurden die Proben mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und auf ein 5%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 3.18.5).

3.18.4 Kompetitionstests

Um die Sequenzspezifität derjenigen Proteine zu überprüfen, die im Zuge der EMSA an die untersuchten Oligonucleotide anbinden, wurde sowohl ein Kompetitionstest mit spezifischem als auch mit einem unspezifischem Kompetitor durchgeführt. Die Ansätze für beide Tests glichen denen der zuvor beschriebenen EMSA-Ansätze, jedoch wurde für die spezifische Kompetition jeweils dasselbe unmarkierte Oligonucleotid in 50fachem molaren Überschuss gegenüber dem markierten Oligonucleotid dazugegeben, für die unspezifische Kompetition entsprechend ein Oligonucleotid mit einer anderen Sequenz, in diesem Falle 5'-GAGTCAGGACCTAGAGAGTTGAAGAGACT-3'. Die Kompetitionstests wurden nach Fertigstellung ebenfalls mit 6xDNA-Ladepuffer (Endkonz. 1x) vermischt und neben den entsprechenden EMSA-Ansätzen auf einem 5%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 3.18.5).

3.18.5 Elektrophorese und Autoradiographie

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Proteinkomplexe wurde ein 5%iges natives Polyacrylamidgel aus 8,3ml Polyacrylamidlösung (30% Acrylamid : 0,8%

Bisacrylamid), 5ml 5xTBE-Puffer, 36,7ml Aqua dest, 50µl TEMED und 0,5ml 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) hergestellt. Nach etwa 60minütiger Polymerisationszeit wurde das Gel in eine mit 0,5xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Multigel: Biometra, Göttingen) überführt und nach dem Auftragen der EMSA-Proben eine ca. 55minütige Elektrophorese bei 100V unter Kühlung bei 10°C durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier (Whatman) transferiert, mit einer Folie blasenfrei abgedeckt und für 1std bei 74°C im Vakuum-Geltrockner getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in einer Filmkassette mit Verstärkerfolien auf einen Röntgenfilm exponiert, der für ca. 1std bei -80°C belichtet wurde. Nach Entwicklung des Films erfolgte die optische Auswertung der Bandshifts.

3.19 Klassische Chromosomenanalyse

3.19.1 Chromosomenpräparation

Die Chromsomenpräparation wurde an Zellen je einer konfluenten Kultur (75cm²-Kulturflaschen) maligner UT-SCC-19A-Zellen und gesunder epithelialer Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes durchgeführt. Dazu wurde dem Nährmedium beider Kulturen zunächst für 30min Colcemid (1µg/ml) zugesetzt, wodurch sich die adhärenenten Zellen vom Untergrund ablösten. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15ml-Tube überführt und für 10min bei 100xg abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 2ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wurde 37°C warme, hypotone KCl-Lösung (75mM) ad 10ml hinzugefügt, und die Zellen im ebenfalls 37°C warmen Wasserbad für 20min einem hypotonen Schock ausgesetzt. Nach erneuter Zentrifugation für 10min bei 100xg und Verwerfen des Überstandes wurde den Zellen für 10min frisch angesetztes eiskaltes Carnoys Fixativ zugesetzt. Diese Arbeitsschritte aus Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und 10minütiger Inkubation in Carnoys Fixativ wurden so lange wiederholt, bis das Sediment weiß war. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Carnoys Fixativ bis auf 1ml abgehoben und darin das Zellpellet resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 2-3 Tropfen auf

einen eiskalten, trockenen Objektträger aufgetropft und die Präparate bei Zimmertemperatur getrocknet.

3.19.2 Darstellung der Chromosomenbanden

Zunächst wurden die Zellpräparate für die mikroskopische Dokumentation von Mitosestadien vorbereitet. Dazu wurden sie für 5min in Giemsa gefärbt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70%, 50%) für jeweils 5sec entfärbt. Über Nacht erfolgte eine Refixierung der Präparate in Carnoys Fixativ. Durch diesen Färbeprozess wurden die sog. G-Banden (Giemsa-Banden) in den Chromosomen sichtbar gemacht, was für die anschließende Dokumentation der Mitosestadien (siehe 3.19.3) erforderlich war. Nach Abschluß der Dokumentation wurde in denselben Präparaten eine sog. R-Banden (Reverse-Banden)-Darstellung nach einem modifizierten Protokoll nach SAHAR und LATT (1978) vorgenommen, um die terminalen Regionen der Chromosomen insbesondere der malignen Zellen besser erkennbar zu machen und eine anschließende Karyotypisierung durchführen zu können. Hierfür wurden die Präparate mit Chromomycin-A3-Gebrauchslösung überschichtet, mit einem Deckgläschen bedeckt und für 30min unter Lichtabschluß gefärbt. Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser gespült und für 5min mit Methylgrün-Gebrauchslösung überschichtet. Unmittelbar danach wurde das Methylgrün abgeschüttet, die Präparate mit Glycerin gespült und eingedeckt.

3.19.3 Auswertung der Chromosomenpräparate

Nach der G-Bandendarstellung wurden die Präparate im Durchlichtmikroskop (Axioplan: Zeiss; Göttingen, Germany) meanderförmig nach Mitosestadien abgesucht. Auswertbare Mitosestadien, die lediglich bei Metaphase-Chromosomen zu beobachten waren, wurden nach Dokumentation ihrer Position im Präparat fotografiert. Nach Darstellung der R-Banden wurden die mitotischen Zellen erneut aufgesucht und im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot: Zeiss) mit der Filterkombination 05 betrachtet und erneut fotografiert. Anschließend wurden die

Mitosestadien digital über eine CCD-Kamera mit Hilfe des digitalen Karyotypisiersystems „Ikaros III“ (MetaSystems; Altlussheim, Germany) dokumentiert und ausgewertet. Auf diese Weise wurde jeweils 10 Karyogramme der malignen UTSCC-19A-Zellen und der gesunden Keratinocyten erstellt. Dabei wurden die Regeln des Internationalen Systems für Human-Cytogenetische Nomenklatur (International System of Human Cytogenetic Nomenclature: ISCN 1995) zugrundegelegt.

3.20 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH)

Zum Nachweis der Lokalisation des LOXL4-Gens auf den Chromosomen der malignen UT-SCC-19A-Zellen wurden verschiedene Untersuchungen mit Hilfe der FISH-Technik durchgeführt. Zum einen erfolgte eine FISH unter Verwendung unterschiedlich farbmarkierter Sonden für das LOXL4-Gen und für die Centromerregion des Chromosoms 10 an Interphase-Chromosomen. Zum anderen wurde eine FISH an Metaphase-Chromosomen durchgeführt, bei der zwei verschiedene Sonden für das LOXL4-Gen verwendet wurden.

3.20.1 Herstellung der Sonden für die FISH

Mittels Datenbankanalyse unter Verwendung des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) wurde zunächst nach geeigneten BAC-Klonen gesucht, die zur Herstellung der LOXL4-Sonden für die FISH an den unterschiedlichen Chromosomenstadien verwendet werden konnten. Für die FISH an Interphase-Chromosomen wurde der das LOXL4-Gen überspannende BAC-Klon RP11-34A14 ausgewählt, für die FISH an Metaphasechromosomen die beiden das LOXL4-Gen flankierenden BAC-Klone RP11-594J24 und RP11-439D8. Die ausgewählten BAC-Klone wurden freundlicherweise von Dr. L. French und Dr. P. Deloukas (Sanger Centre, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt. Um aus den BAC-Klonen entsprechende Sonden herzustellen, wurden sie über Nacht in 250ml LB-Medium inklusive 100mg/ml Chloramphenicol bei 37°C im rotierenden Hybridisierungssofen

angezüchtet und am Folgetag einer Plasmid-Isolierung mit Hilfe des „Perfectprep Plasmid Maxi Kits“ (Eppendorf; Köln, Germany) nach Angaben des Herstellers unterzogen. Die Durchführung dieser Plasmidisolierung verlief nach einem ähnlichen Prinzip wie unter 3.9.2 beschrieben, jedoch in einem größeren Maßstab.

Die isolierten Plasmide wurden anschließend durch Random Priming unter Verwendung des „Bioprime DNA Labeling Systems“ (Life Technologies; Karlsruhe, Germany) amplifiziert und durch Einbau von dUTP-spectrum green (SG: Vysis; Downers Grove, USA) oder dUTP-spectrum orange (SO: Vysis) markiert. Dazu wurde 1µg der jeweiligen Plasmid-DNA in Aqua dest. ad 24µl verdünnt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20µl der 2,5x Random-Primer-Lösung, eine Denaturierung im kochenden Wasserbad für 5min und eine unmittelbare Inkubation auf Eis. Anstatt des dem Kit beigefügten 10xdNTP-Mix wurden 5µl dNTP-Mix bestehend aus 10mM dCTP, 10mM dGTP, 10mM dATP und 10mM dUTP-SG oder dUTP-SO zu dem Reaktionsansatz gegeben, wonach dieser durch Umwickeln des Reaktionsgefäßes mit Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt wurde. Nach Zufügen von 1µl (40U) Klenow-Fragment erfolgte eine Inkubation des Ansatzes in einem 37°C warmen Brutschrank über Nacht. Die markierten Sonden wurden am Folgetag über Sephadex G-50-Säulen (siehe 3.20.2) aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurden jeweils 200ng einer markierten Sonde mit 5µg Cot1-DNA copräzipitiert (siehe 3.10.2) und anschließend in 10µl Master Mix bestehend aus 2xSSC, 50% Formamid und 10% Dextran Sulfat resuspendiert. Damit waren die Sonden gebrauchsfertig.

Die Sonde gegen die Centromerregion des Chromosoms 10 wurde käuflich erworben (CEP 10: Vysis, Downers Grove, USA).

3.20.2 Aufreinigung von Oligonucleotiden mit SEPHADEX-G50-Säulen

Die markierten FISH-Sonden (siehe 3.20.1) wurden vor ihrem Einsatz im Master Mix über Sephadex-G50-Säulen aufgereinigt, um nicht eingebaute Nucleotide, Enzyme und Puffersubstanzen zu entfernen. Zur Herstellung einer Säule wurde eine 1ml-Einwegspritze mit einem kompakten Stopfen aus steriler Glaswolle versehen, in ein 15ml-Tube gestellt und mit 900µl Sephadex-G50-Matrix (in 1xTE) gefüllt. In 2-5 Zyklen aus Zentrifugation für 4min bei 2000rpm (Centrifuge 5804 R) und Nachfüllen der Matrix wurden die Röhrchen bis zur 900µl-Marke mit dem Polymer beschickt.

Nach 2maligem Waschen der Säule mit jeweils 100µl TE-Puffer und anschließender Zentrifugation für 4min bei 2000rpm (Centrifuge 5804 R), erfolgte die Aufreinigung der FISH-Sonden. Dazu wurde eine Sephadex-Säule in ein frisches 15ml-Tube mit einem darin befindlichen 1,5ml-Tube überführt, mit ca. 50µl einer FISH-Sonde beladen, bei 2000rpm für 4min (Centrifuge 5804 R) zentrifugiert und anschließend verworfen. Die im 1,5ml-Tube aufgefangene, gereinigte Sonde wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (siehe 3.14) im Master Mix (siehe 3.20.1) eingesetzt.

3.20.3 Vorbereitung der Chromosomenpräparate für die FISH

Nach dem unter 3.19.1 beschriebenen Verfahren wurden Chromosomenpräparate aus nicht mehr als 3000 UT-SCC-19A-Zellen pro Objektträger erstellt, die über ein Areal von 0,5cm ausgebreitet waren. Die Präparate wurden nach ihrer Fertigstellung unter einem Phasenkontrastmikroskop nach geeigneten Stellen für die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung überprüft. Diese Stellen befanden sich vorwiegend an der Peripherie der Präparate, wo es zu keiner Überlagerung von Zellen gekommen war, und zeichneten sich durch eine hohe Dichte an klar getrennt liegenden Zellkernen aus. Derartige Bereiche wurden auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Glasschreiber markiert.

Vor der eigentlichen FISH wurden die Präparate zunächst einem Vorverdau unterzogen. Dazu wurden sie in einer Küvette mit frischer, nicht vorgewärmter Digestionslösung für 5min bei 37°C inkubiert und anschließend in Aqua bidest gewaschen. Danach erfolgte ein Fixieren der Präparate in 1%iger Paraformaldehydlösung für 2min im Kühlschrank, wonach erneut mit Aqua bidest gewaschen wurde. Es folgte eine Entwässerung der Präparate in 70%igem, 85%igem und 100%igem Ethanol für jeweils 2min. Danach wurden die Präparate an der Luft getrocknet, und es schloß sich die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung an.

3.20.4 FISH

Für die Durchführung der FISH wurden 1,3µl einer gebrauchsfertig hergestellten Sonde (siehe 3.20.1) auf ein rundes Deckgläschen (Ø 10mm) gegeben, das anschließend auf die markierte Stelle eines Chromosomenpräparates aufgelegt und mit Fixogum abgedichtet wurde. Die Präparate wurden danach in einen Metallkasten gelegt und in diesem für 7min in einem 75°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein feuchtes Tuch auf den Boden des Kastens gelegt und die Präparate über Nacht im Brutschrank bei 37°C hybridisiert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen von den Chromosomenpräparaten abgelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass die Präparate lichtgeschützt gehalten wurden und nicht austrockneten. Die Präparate wurden unmittelbar danach in einer Küvette mit auf 71°C vorgewärmter Lösung I (2ml 20xSSC, 300µl Igepal, Aqua dest ad 100ml) für 2min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Lösung II (10ml 20xSSC, 100µl Igepal, Aqua dest ad 100ml) bei RT für 1min, wonach kurz mit 2xSSC gespült wurde. Es erfolgte eine Färbung der Chromosomenpräparate in DAPI für 5min und erneutes Spülen in 2xSSC. Danach wurden die Präparate luftblasenfrei in Antifade-Lösung eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 Fluoreszenzmikroskop: Zeiss, Göttingen, Germany) mit geeigneten Filtern (AHF; Tübingen, Germany) betrachtet. Die Dokumentation bestimmter Chromosomenstadien erfolgte unter Verwendung des ISIS Imaging Systems (MetaSystems; Altusheim, Germany).

4 Ergebnisse

4.1 DDRT-PCR

Zu Beginn dieser Arbeit galt es, das mRNA-Expressionsmuster von Plattenepithelkarzinomzellen und gesunden epithelialen Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes vergleichend zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus Zellen der Larynxkarzinomzelllinie UT-SCC-19A und einer Kultur des entsprechenden gesunden Zelltyps isoliert und anschließend einer DDRT-PCR nach BAUER *et al.* (1993) unter Verwendung der Primerkombination D2/U12 (Sequenzen siehe Tabelle 9.3.1) unterzogen. Bei einem Vergleich des Bandenmusters der unterschiedlichen Zelltypen konnte ein differentiell exprimiertes Genfragment nachgewiesen werden, das eine starke Überexpression in den Karzinomzellen jedoch nur eine äußerst schwache Expression in den gesunden Zellen aufwies. Zwecks näherer Charakterisierung wurde das Fragment aus dem getrockneten Polyacrylamidgel isoliert, reproduzierbar reamplifiziert und kloniert.

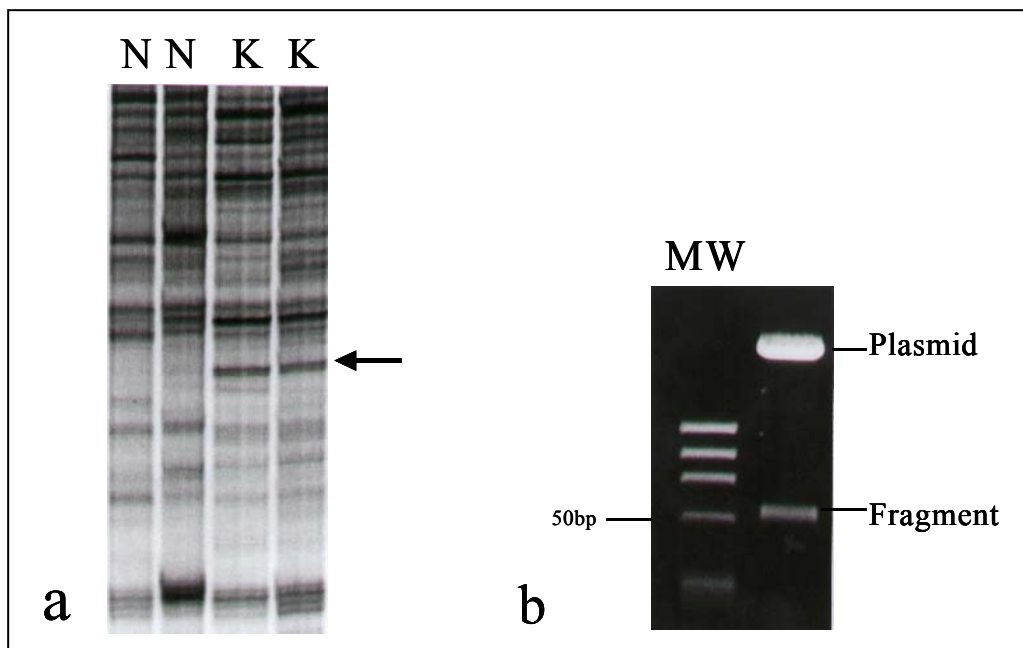


Abb 4.1: DDRT-PCR

a: Vergleich des mRNA-Expressionsmusters von UT-SCC-19A-Karzinomzellen (K) und entsprechenden gesunden Zellen (N) durch DDRT-PCR nach BAUER *et al.* (1993) unter Verwendung der Primerkombination D2/U12. Das in den Tumorzellen überexprimierte Genfragment ist durch den Pfeil gekennzeichnet. b: Das differentiell exprimierte Genfragment wurde isoliert, reamplifiziert und kloniert. Nach Exzision aus dem Plasmidvektor wurde es auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2 Homologieanalyse des differentiell exprimierten Fragmentes

Nach seiner Klonierung wurde das differentiell exprimierte DNA-Fragment sequenziert, wodurch seine Größe auf genau 59bp bestimmt werden konnte. Die ermittelte DNA-Sequenz wurde im November 2000 einem Homologievergleich mit Sequenzen bekannter Gene der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologische Informationen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unterzogen. Dabei konnte eine 100%ige Übereinstimmung mit einem Abschnitt einer humanen cDNA-Sequenz (Accession Number (Acc. No.): AK025542) von 2059bp festgestellt werden, die bis dato keinem bekannten Gen zugeordnet werden konnte und daher als FIS-Clone (Full-Insert-Clone) bezeichnet wurde. Die Position des Fragmentes innerhalb der FIS-Clone-Sequenz ist in Abb. 4.2 dargestellt.

bp						
1-60	tgatgagtgg	ggcgcgctgc	tcaggcacag	agctggccct	gcagcagtgc	cagaggcacg
61-120	ggccggtgca	ctgctcccac	gggtggcggc	gcttctctggc	tggagtctcc	tgcatggaca
121-180	gtgcaccaga	cctggtgatg	aacgcccagc	tagtgcagga	gacggcctac	ttggaggacc
181-1200	[...]					
1201-1260	ccaaaataca	cagcaggtag	tgtagctct	ctgctaggag	ctcaaagcaa	cacaactgt
1261-1320	atcaaaatca	<u>caactggcag</u>	<u>agaagctggt</u>	ggatccaatc	ctttctcat	ctgtgttat
1321-1380	ttagaactca	cctctcacac	tctgtcttt	agtgtcctta	cctttatctt	accacacaca
1381-1440	tgggtgtttc	tattatcctt	ggaagcacag	acctcgggca	tcccctatt	gcctgatggg
1441-1500	ccaacaccaa	cagttacgga	gtgcttgaga	aggggcaagt	ttcacagaaa	tggccagata
1501-1560	gggccttcct	acagagcagc	aagagtaggc	caagcagaaa	gtctgctgag	gtaacacgga
1561-1620	ccccagcccc	tgtcagggcc	tctccaagg	aaataatatg	gaccatttac	ctggcaggca
1621-1680	gtctgctctc	tctcaggatc	accacgcac	tcaggattgg	tctaaacttc	aagtctcaac
1681-1740	caagtgtttg	aagtgaactt	tgcatgaat	aaattttgc	catggaaaga	acatcaaaca
1741-1800	agccactcat	ctctacagag	ataagaaaac	aagtttgga	gagcaagaga	cagaagaccg
1801-1860	tggagaaatc	agaaggggga	acagtcagtt	tagttaagga	tggaacctgg	gaaaggccac
1861-1920	cattcctgct	tgatggggct	ctgatttgct	cttgctcaag	tggaataaaa	cccatgggtc
1921-1980	ttcttgacat	gattcttgat	ctttctcca	ctgagacaca	cttaagtgat	gatccttaca
1981-2040	ggactgacac	cctaagcca	ataaaagttg	ctcattatgg	actgctacaa	aaaaaaaaaa
2041-2059	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa				

Abb. 4.2: cDNA-Sequenz des FIS-Clone (Acc. No. AK025542).

Das differentiell exprimierte Fragment (59bp) ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die Primer, die zur Herstellung der DIG-markierten cDNA-Sonde (ca. 640bp) verwendet wurden, sind einfach unterstrichen.

4.3 Northern Hybridisierung

Um die differentielle Expression des Fragmentes bzw. der FIS-Clone-cDNA-Sequenz zu bestätigen und die Spezifität des Nachweises zu erhöhen, wurden Northern Hybridisierungen durchgeführt. Dazu wurde eine DIG-markierte cDNA-Sonde, die einen 640bp-Abschnitt der FIS-Clone-Sequenz (Acc. No. AK025542, Pos. 1268-1907; FIS-Sonden-Primer siehe Tabelle 9.3.1) repräsentierte, gegen RNA aus den in der DDRT-PCR verwendeten Zelltypen hybridisiert. Die Verwendung einheitlicher RNA-Mengen wurde durch Rehybridisierung desselben RNA-Blots mit einer 360bp langen DIG-markierten cDNA-Sonde für das GAPDH-Housekeeping-Gene (Acc. No. BC029618, Pos. 28-387) kontrolliert.

Die Hybridisierungsergebnisse bestätigten die spezifische differentielle Expression des in der DDRT-PCR gefundenen Gens bzw. der FIS-Clone-Sequenz. Die Größe des nachgewiesenen mRNA-Moleküls betrug ca. 4kb, was jedoch nicht mit der in der Datenbank angegebenen Größe der FIS-Clone-Sequenz von 2059bp übereinstimmte. Aufgrund dieser Größendiskrepanz ließ sich annehmen, dass die FIS-Clone-Sequenz kein vollständiges mRNA-Molekül repräsentierte.

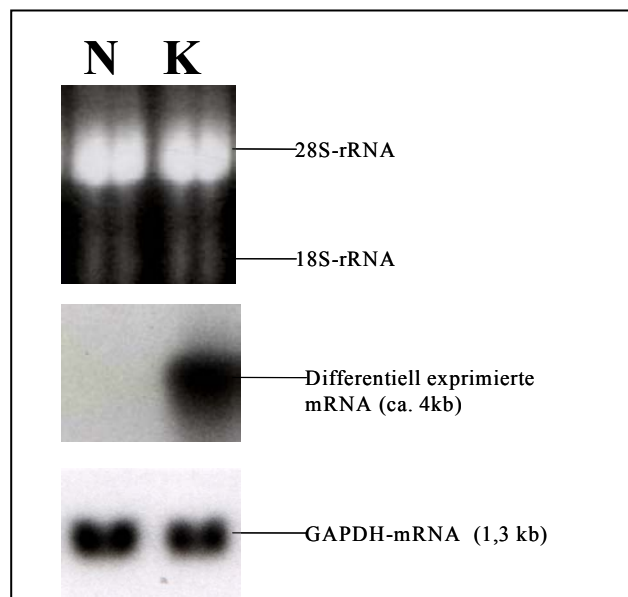


Abb. 4.3: Nachweis der differentiellen Genexpression durch Northern Hybridisierung.

Jeweils 10µg RNA der UT-SCC-19A-Karzinomzellen (K) und gesunder epithelialer Schleimhautzellen des Kopf-Hals-Bereichs (N) wurden einer Northern Hybridisierung unterzogen. Das obere Bild zeigt die 18- und 28S-rRNA-Banden im formaldehyd-haltigen Agarosegel. Das mittlere Bild zeigt die durch Northern Hybridisierung nachgewiesene mRNA-Expression des dem DDRT-PCR-Fragment zugehörigen Gens (ca. 4kb). Das untere Bild zeigt die GAPDH-mRNA-Expression nach Rehybridisierung desselben Blots.

4.4 5'RACE-PCR

Um die Unvollständigkeit der FIS-Clone-Sequenz (Acc. AK025542; siehe Abb.4.2) zu beweisen, und um das bisher unbekannte 5'Ende dieses cDNA-Moleküls zu ermitteln, wurde eine 5'RACE-PCR unter Verwendung eines genspezifischen Primers (GSP) mit der Sequenz 5'-GTCTGGTGCACTGTCCATG-3' (Acc. No. AK025542, Pos. 113-131) und eines Adaptorprimers (siehe 3.12) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die 5'RACE-Technik diente mRNA aus UTSCC-19A-Karzinomzellen. Mit Hilfe dieser Technik gelang die Amplifikation eines 639bp langen DNA-Fragmentes (siehe Abb. 4.4), das anschließend zwecks weiterer Charakterisierung kloniert und sequenziert wurde. Anhand der ermittelten Sequenz konnte gezeigt werden, daß das 5'RACE-PCR-Produkt eine Verlängerung der FIS-Clone-Sequenz in 5'-Richtung darstellte (Abb. 4.4), was dessen Unvollständigkeit bewies.

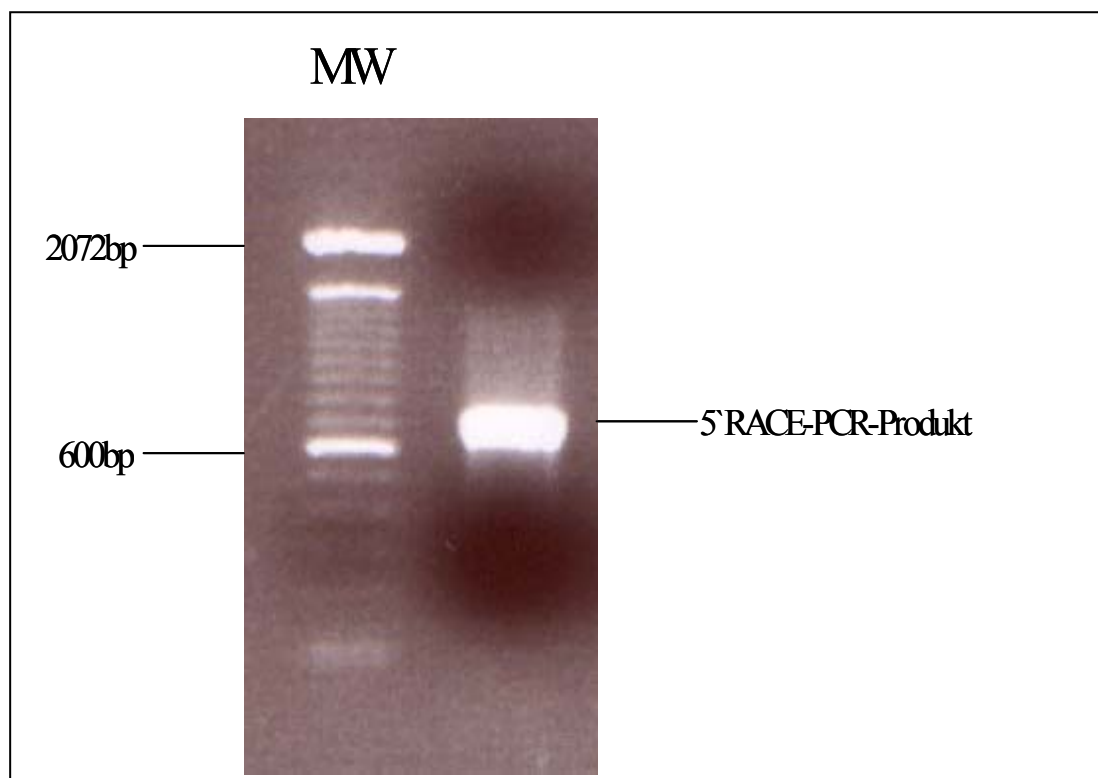


Abb. 4.4: Verlängerung der FIS-Clone-Sequenz (Acc. No. AK025542) durch 5'-RACE-PCR. Die Abbildung zeigt das amplifizierte 5'RACE-Produkt (639bp) nach Auftrennung im Agarosegel. MW=Molekulargewichtsmarker

bp						
1-57	ggccggg	tggaagtgt	catgaaccgc	cagtggggca	cggtctgtga	ccacaggtgg
58-117	aacctcatct	ctgccagtgt	cgtgtgtcgt	cagctgggct	ttggctctgc	tcgggaggcc
118-177	ctctttgggg	cccggctggg	ccaagggcta	gggcccattc	acctgagtga	gggtgcgtgc
178-237	aggggatatg	agcggaccct	cagcgactgc	cctgccctgg	aagggcccca	gaatggttgc
238-297	caacatgaga	atgatgtctg	tgtcaggtgc	aatgtcccta	acatgggctt	tcagaatcag
298-357	gtgcgcttgg	ctggtgggcg	tatccctgag	gaggggctat	tggaggtgca	gggtggaggtg
358-417	aacgggggtcc	cacgctgggg	gagcgtgtgc	agtgaaaact	gggggctcac	cgaagccatg
418-477	gtggcctgcc	gacagctcgg	cctgggtttt	gccatccatg	cctacaagga	aacctggttc
478-537	tggtcgggga	cgccaagggc	ccaggaggtg	gtgatgagtg	gggtgcgctg	ctcaggcaca
538-597	gagctggccc	tgcagcagtg	ccagaggcac	gggccgggtgc	actgctccca	cggtggcggg
598-657	cgcttcttgg	ctggagtctc	ctgcatggac	agtgcaccag	acctggtgat	gaacgccccag
658-717	ctagtgcagg	agacggccta	ctggaggac	cgcccgtca	gccagctgta	ttgtcccac
[...]						

Abb. 4.5: Durch 5'RACE-PCR verlängerte FIS-Clone-cDNA-Sequenz.

Das 5'RACE-PCR-Produkt (639bp) ist durch Fettdruck hervorgehoben. Es stellt eine Verlängerung der FIS-Clone Sequenz (Acc. No. AK025542; hier grau unterlegt) in 5'Richtung dar. Der verwendete genspezifische Primer ist doppelt unterstrichen.

4.5 Identifizierung des 5'RACE-PCR-Produktes

Nach der Sequenzierung des 5'-RACE-Produktes (siehe Abb. 4.5) im August 2001 wurde ein erneuter Homologievergleich mit Sequenzen bekannter Gene der Human GenBank durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde dadurch als ein Teilstück des humanen LOXLC-cDNA-Moleküls (*Homo sapiens lysyl oxidase-related protein C* mRNA; 2271bp; Acc. No. AF338441) identifiziert, dessen Sequenz erst kurz zuvor durch ITO *et al.* (Juli 2001) bekannt gegeben worden war.

Im November 2001 veröffentlichten ASUNCION *et al.* dieselbe Sequenz, jedoch unter der Bezeichnung „*Homo sapiens lysyl oxidase-like 4 (LOXL4) mRNA* (2271bp; Acc. No. AF395336)“. Bei einem Vergleich der cDNA-Sequenzen von LOXL4 (Acc. No. AF395336) und dem ursprünglichen FIS-Clone (Acc. No. AK025542) konnte eine Überschneidung festgestellt werden, wodurch sich beide Sequenzen zu einer kompletten cDNA-Sequenz des für LOXL4 codierenden Gens von 3531bp ergänzten (siehe Abb. 4.6).

bp						
1-29				atggcgagg	tccccaccag	ccaccctctt
30-89	tctgttctg	ctgctgctag	gccagccccc	tcccagcagg	ccacagtcac	tgggcaccac
90-149	taagctccg	ctggtgggcc	cagagagcaa	gccagaggag	ggccgcctgg	agggtctgca
150-209	ccagggccag	tggggcaccg	tgtgtgatga	caactttgct	atccaggagg	ccacagtggc
210-1289	[...]					
1290-1349	ggaggggcta	ttggagggtg	agggtggagg	gaacgggggc	ccacgctggg	ggagcgtgtg
1350-1409	cagtgaanaa	tgggggctca	ccgaagccat	ggtggcctgc	cgacagctcg	gcttgggttt
1410-1469	tgcatccat	gcctacaagg	aaacctggtt	ctggtcgggg	acgccaaggg	cccaggaggt
1470-1529	ggtgatgagt	gggtgctgct	gctcaggcac	agagctggcc	ctgcagcagt	gccagaggca
1530-1589	cgggccggtg	cactgctccc	acggtgccc	gcttctctg	gctggagctt	cctgcatgga
1590-1649	cagtgcacca	gacctggtga	tgaacgcca	gctagtgcag	gagacggcct	acttggagga
1650-1709	ccggccgctc	agccagctgt	attgtgcca	cgaggagaa	tgctctcca	agtctgcgga
1710-1769	tcacatggac	tggccctacg	gataccgccc	cctattgccc	ttctccacac	agatctacaa
1770-1829	tctgggccgg	actgactttc	gtccaaagac	tgacgcgat	agctgggttt	ggcaccagtg
1830-1889	ccacaggcat	taccacagca	ttgaggtctt	caccactac	gacctcctca	ctctcaatgg
1890-1949	ctccaaggta	gctgaggggc	acaaggcca	cttctgtctg	gaggacacaa	actgcccac
1950-2009	aggatgcag	cgccgctacg	catgtgcca	ctttggagaa	caggagtgga	ctgtaggctg
2010-2069	ctgggacacc	taccggcatg	acattgattg	ccagtgggtg	gatatcacag	atgtgggccc
2070-2129	cggaattat	atcttcagg	tgattgtgaa	ccccactat	gaagtggcag	agtcagattt
2130-2189	ctccaactat	atgctgcagt	gccgctgcaa	gtatgatggg	caccgggtct	ggctgcacaa
2190-2249	ctgccacaca	gggaattcat	accagccaa	tgagaactc	tccctggagc	aggaacagcg
2250-2309	tctcaggaac	aacctcatct	gaagctgtca	ctgcacactc	ctagctgctg	ccgatacacc
2310-2369	agatacctca	gcttattgga	gccatgccct	tcacagagtc	ccaactcaga	ggaaaagggc
2370-2429	cagtgccaa	gggcaccaag	aacctgctca	ggaagccttt	tgatggcaag	atcaccaatc
2430-2489	cagatggtat	tgctccctca	ggatggctct	gggcctgccc	ctaagggcct	gtggcctatg
2490-3389	[...]					
3330-3389	accattcctg	cttgatgggg	ctctgatttg	ctctgtctca	agtgaataa	aaccccatgg
3390-3449	tctcttgac	atgattcttg	atcttttctc	cactgagaca	cacttaagt	atgatcctta
3450-3509	caggactgac	accctaattg	caataaaagt	tgctcattat	ggactgctac	aaaaaaaaaa
3510-3531	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa			

Abb. 4.6: Rekonstruierte LOXL4-cDNA-Sequenz.

Die abgebildete Sequenz (3531bp) wurde nach einem Vergleich der Datenbanksequenzen AK025542 und AF338441 rekonstruiert, welche sich überschneiden und zu dieser kompletten LOXL4-cDNA-Sequenz ergänzen. Die Überschneidungsregion ist unterstrichen.

4.6 Vergleichende Analyse der LOXL4-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes

Nachdem das differentiell exprimierte Fragment als Teilstück der LOXL4-mRNA identifiziert worden war (siehe 4.6), galt es, ihren Expressionslevel in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden RNA-Proben aus 15 verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien, 55 entsprechenden Tumorbiopsaten, 30 benignen Tumorbiopsaten und 13 Kulturen gesunder Schleimhautzellen mittels Northern Hybridisierung untersucht. Eine

detaillierte Auflistung dieser Zelllinien und Biopsate unter Angabe ihrer histopathologischen Parameter ist der Tabelle 9.3.1 im Anhang der Arbeit zu entnehmen. Für die hier durchgeführte Analyse wurde erneut die DIG-markierte FIS-Clone-cDNA-Sonde bzw. LOXL4-cDNA-Sonde von 639bp (siehe 4.3) verwendet und anschließend zur Kontrolle eine Rehybridisierung mit der DIG-markierten GAPDH-cDNA-Sonde (360bp) durchgeführt.

Nach Detektion aller Hybridisierungssignale konnte in 2 der 13 Proben gesunder Zellen eine sehr schwache, in allen übrigen Proben dieses Zelltyps jedoch keine LOXL4-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die beiden schwachen Banden wurden daher als normale Expression des LOXL4-Gens (+), und alle weiteren Banden stärkerer Intensität als Überexpression (++ und +++) definiert. Nach dieser Festlegung wurde in 8 von 15 Tumorzelllinien (53%) eine Überexpression der LOXL4-mRNA nachgewiesen, sowie in 30 von 55 malignen (54%) und in 8 von 30 benignen Tumorbiosaten (26%). Diese Resultate sind noch einmal in Tabelle 9.3.1 aufgeführt und dort den entsprechenden Zellen bzw. Biopsaten zugeordnet. Als Bestätigung für die Verwendung einheitlicher RNA-Mengen wurde in allen Proben eine GAPDH-mRNA-Expression gleicher Intensität nachgewiesen.

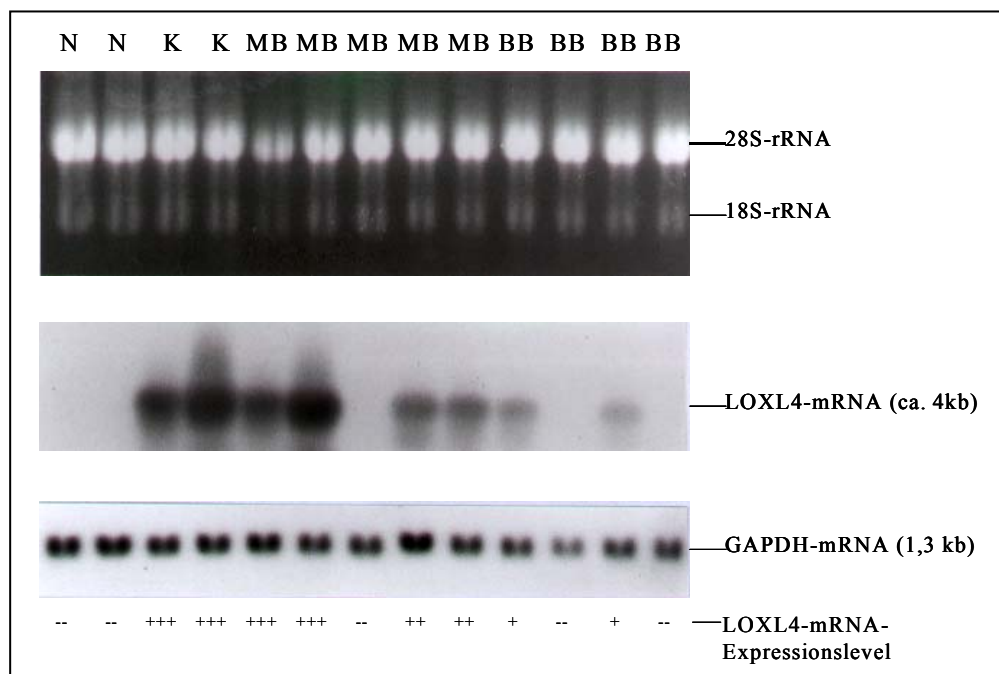


Abb. 4.7: Nachweis der LOXL4-mRNA mittels Northern Hybridisierung.

Jeweils 10µg Gesamtzell-RNA verschiedener Zelltypen wurden mittels Northern Hybridisierung auf eine LOXL4-mRNA-Expression hin untersucht, von denen hier 13 Proben exemplarisch dargestellt sind: N=Kulturen gesunder epithelialer Schleimhautzellen, K=HNSCC-Zelllinien, MB=HNSCC-Biopsate und BB=Biopsate benigner Tumore des oberen Aerodigestivtraktes. Obere Abbildung: Darstellung der 18S- und 28S-rRNA. Mittlere Abbildung: LOXL4-mRNA-Expression. Untere Abbildung: Nachweis der GAPDH-mRNA als Kontrolle. LOXL4-mRNA-Expressionslevel siehe Text.

4.7 Statistische Auswertung der mittels Northern Hybridisierung gewonnen Resultate

Vorbemerkung zur TNM Klassifizierung - Das TNM-System dient allgemein der Einordnung von Tumoren und lässt sich wie folgt deuten: T steht für die Größe eines Tumors, die jeweils an seiner größten Ausdehnung bemessen wird. Ein Tumor der Klassifikation T1 hat eine Größe von bis zu 2cm, T2 mehr als 2cm, T3 mehr als 4cm, und ein T4-Tumor breitet sich bereits in Nachbarstrukturen wie Knochen oder Skelettmuskeln aus. N gibt die Einteilung der Lymphknotenmetastasen an. Bei N0 liegen keine Lymphknotenmetastasen vor. N1 zeigt eine Lymphknotenmetastase von bis zu 3cm Ausdehnung an, N2 eine bis mehrere 3-6cm große Lymphknotenmetastasen und N3 Lymphknotenmetastasen von mehr als 6cm Größe. M0 und M1 bedeuten keine bzw. vorhandene Fernmetastasen.

Die in Tabelle 9.3.1 aufgeführten Resultate der vorangegangenen Northern Hybridisierungen wurden unter Anwendung des Fisher-Exact-Tests statistisch ausgewertet, wobei besonders die Daten der TNM-Klassifizierung bedeutend waren. Durch diese Analyse galt es Korrelationen zwischen den folgenden Parametern zu überprüfen:

- A) LOXL4-mRNA-Expression und Metastasierung der untersuchten Tumore,
- B) LOXL4-mRNA-Expression und Tumorgöße,
- C) LOXL4-mRNA-Expression und Anzahl der Lymphknotenmetastasen bei den betroffenen Krebspatienten
- D) LOXL4-mRNA-Expression und Anzahl der Fernmetastasen.

Bei Anwendung des Fisher-Exact-Tests liegt nur dann eine signifikante Korrelation vor, wenn $p < 0,05$ ist. Hieraus folgend konnte zwischen der LOXL4-mRNA-Expression und der Metastasierung der untersuchten Kopf-Hals-Karzinome (Abb. 4.8 A), sowie zwischen LOXL4-mRNA-Expression und Tumorgöße (Abb. 4.8 B) eine positive, signifikante Korrelation mit jeweils $p = 0,01$ nachgewiesen werden. Tendenziell zeichnete sich auch zwischen der LOXL4-mRNA-Expression und der Anzahl der Lymphknoten- und Fernmetastasen eine Korrelation ab, die jedoch mit Werten von $p = 0,09$ und $p = 0,7$ nicht signifikant waren.

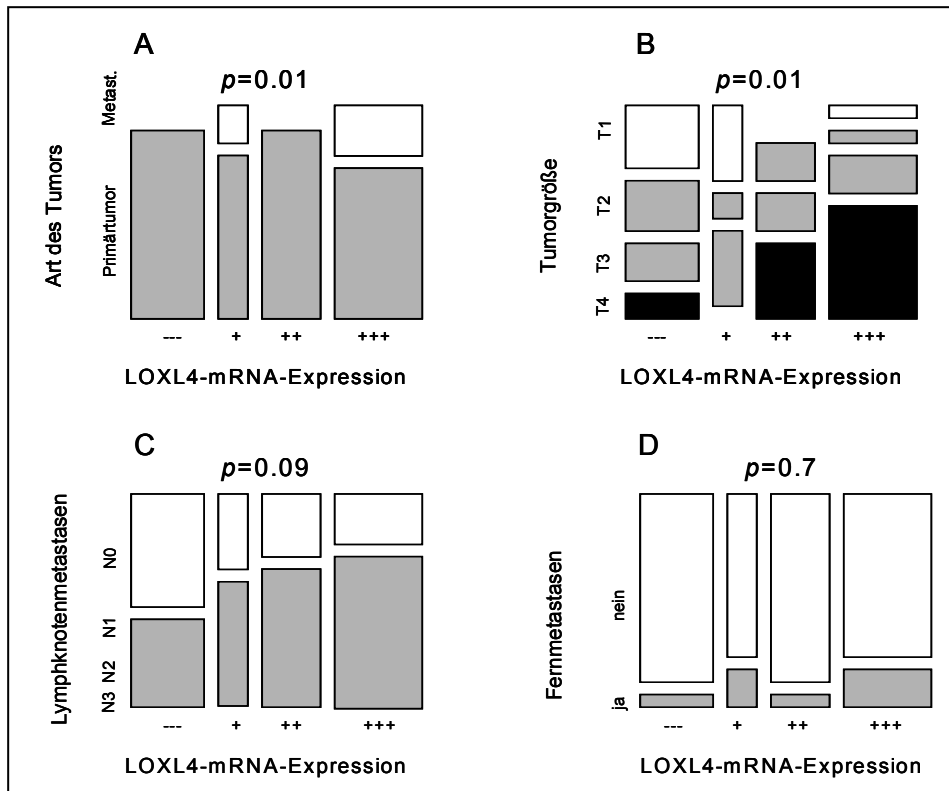


Abb. 4.8: Statistische Auswertung der Northern-Blot-Analysen.

Die dargestellten Mosaikplots zeigen Korrelationen zwischen dem LOXL4-mRNA-Expressionslevel gegenüber der Art der untersuchten Tumore (A) und deren TNM-Klassifikation (B, C, D). Die Variationen des LOXL4-mRNA-Expressionslevels wurden definiert als keine Expression (---), normale Expression (+) und Überexpression (++ und +++). Durch die unterschiedlichen Farben wird in Bild A) zwischen Metastase und Primärtumor, in Bild B) zwischen T1-4, in Bild C) zwischen N0 und N1-3 und in Bild D) zwischen nachgewiesenen und nicht nachgewiesenen Fernmetastasen unterschieden. Die Länge der Balken ist jeweils proportional zur Anzahl der entsprechenden Tumore (siehe Tabelle 9.3.1). Die Korrelationen wurden mittels Fisher-Exact-Test ermittelt, nach dem lediglich eine signifikante Korrelation bei $p < 0,05$ bestand, in diesem Falle bei A) und B).

4.8 Nuclear-Run-On

Die Spezifität der differentiellen Expression der LOXL4-mRNA in malignen und gesunden Plattenepithelzellen des Kopf-Hals-Bereichs war zwar zuvor mittels Northern Hybridisierung bestätigt worden, jedoch gab diese Methode keine Auskunft darüber, ob das Gen in den Tumorzellen tatsächlich stärker transkribiert oder das entsprechende mRNA-Molekül in den gesunden Zellen schneller destabilisiert wird. Um diese Frage beantworten zu können, wurde eine Nuclear-Run-On-Analyse durchgeführt, mit deren Hilfe die de-novo-Transkription des LOXL4-Gens im malignen und gesunden Zelltyp überprüft werden sollte.

Als Resultat dieser Untersuchung konnte eine de-novo transkribierte LOXL4-mRNA in den Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.9), in den gesunden Zellen jedoch nicht. Um eine unterschiedliche Qualität der verwendeten nativen Zellkerne ausschließen zu können, war zur Kontrolle die de-novo-Transkription des GAPDH-Housekeeping-Gens co-analysiert worden, die für beide Zelltypen identisch ausfiel.

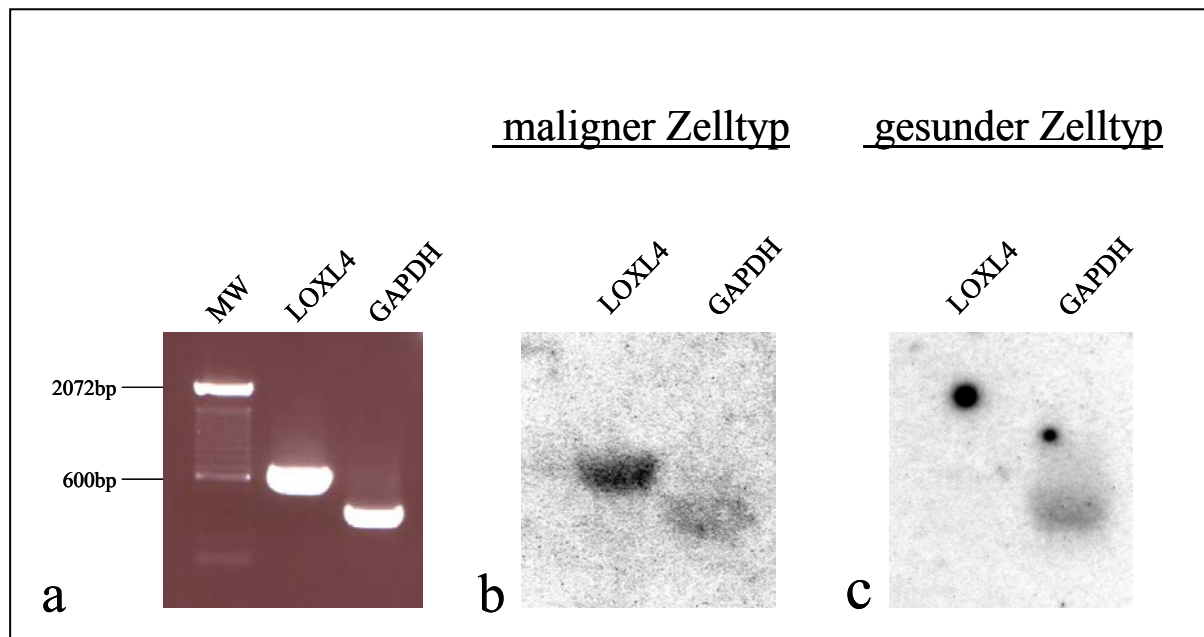


Abb. 4.9: Nuclear-Run-On-Analyse.

Jeweils 5µg eines durch PCR-amplifizierten LOXL4-cDNA-Fragmentes (640bp) und GAPDH-cDNA-Fragmentes (360bp) wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (a), auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und durch UV-Cross-Linking immobilisiert. Gegen die cDNA-Fragmente wurde RNA aus nativen Zellkernen maligner UT-SCC-19A-Zellen und gesunder Keratinocyten hybridisiert, die zuvor einem Nuclear-Run-On unter Einsatz von radioaktivem [α^{32} P]UTP unterzogen worden waren. Die Bilder b) und c) zeigen die Hybridisierungsergebnisse nach Autoradiographie. An ihnen wird deutlich, dass lediglich in den Tumorzellen eine de-novo-Transkription des LOXL4-Gens stattgefunden hatte, da durch die identische Intensität des GAPDH-Hybridisierungssignals in beiden Zelltypen Qualitätsunterschiede der verwendeten Zellkerne ausgeschlossen werden konnten.

4.9 Exon/Intron-Organisation des LOXL4-Gens

4.9.1 Aufklärung der Exon/Intron-Organisation

Durch die vorangegangenen Untersuchungen mit Hilfe der 5`RACE-Technik und anschließender Datenbankanalyse konnte bereits das bislang unbekannte 5`-Ende des differentiell exprimierten Gens rekonstruiert und seine vollständige cDNA-Sequenz erfasst werden (siehe 4.5). Um zukünftig weitere Analysen am LOXL4-Gen durchführen zu können, galt es, seine Gesamtgenesequenz sowie die Exon/Intron-Organisation zu ermitteln. Nachdem die rekonstruierte cDNA-Sequenz einer erneuten Homologiesuche mit in der GenBank gespeicherten Sequenzen unterzogen worden war, konnte eine humane Klonsequenz (Acc. No. AL139241; Klon RP11-34A14) ermittelt werden, die ein Teilstück des Chromosoms 10 repräsentierte, und die abschnittsweise eine 100%ige Homologie zur LOXL4-cDNA-Sequenz aufwies. Nach Erstellen eines Alignments konnten insgesamt 14 homologe Abschnitte in der Datenbanksequenz gefunden werden, die insgesamt die vollständige LOXL4-cDNA-Sequenz widerspiegeln. Da die Anzahl der Abschnitte mit der in der Literatur angegebenen Anzahl der LOXL4-Exone (ASUNCION *et al.*, 2001) übereinstimmte, wurde angenommen, dass die Datenbanksequenz AL139241 das gesamte LOXL4-Gen inklusive der noch nicht identifizierten untranslatierten Regionen enthielt, und dass das erstellte Alignment als eine prospektive Exon/Intron-Organisation angesehen werden konnte.

Um diese bestätigen zu können, wurden alle prospektiven Exone und Introne inklusive der Exon/Intron-Übergänge mit Hilfe spezifischer Primer (siehe Anhang, Tabelle 9.3.1), die aus der Sequenz AL139241 ermittelt wurden, in Polymerase-Kettenreaktionen amplifiziert (PCR-Parameter siehe Tabelle 9.3.1). Als Template wurde genomische DNA aus gesunden epithelialen Schleimhautzellen verwendet. Nachfolgende Sequenzierungen verifizierten die prospektive Exon/Intron-Organisation, die in Abb. 4.10 schematisch dargestellt ist. Die Länge der einzelnen Exons und Introns ist in Tabelle 4.1 aufgeführt. Demnach hat das LOXL4-Gen eine Gesamtlänge von 15693bp. Zwischen der Transkriptions-Initiationsstelle (+1) und dem Exon-1 liegt eine zur 5`-untranslatierten Region (5`UTR) gehörende „Leader“-Sequenz von 384bp (nicht in der Tabelle aufgeführt). Zudem beinhaltet das

Transkript eine 1230bp lange vom Stop-Codon (TGA) stromabwärts gelegene 3'-untranslatierte „Trailer“-Sequenz (3'UTR).

Tabelle 4.1: Exon/Intronorganisation des LOXL4-Gens.

Exon/Intron-Nr.	Exonposition	Exongröße (bp)	Intronposition	Introngröße (bp)
1	385-662	278	663-1191	529
2	1192-1370	179	1371-2277	907
3	2278-2483	206	2484-3975	1492
4	3976-4014	39	4015-4176	162
5	4177-4396	220	4397-5240	844
6	5241-5424	184	5425-5600	176
7	5601-5757	157	5758-6459	702
8	6460-6625	166	6626-7665	1040
9	7666-7830	165	7831-9600	1780
10	9611-9852	242	9853-10936	1084
11	10937-11052	116	11053-11682	630
12	11683-11820	138	11821-12209	389
13	12210-12320	111	12321-14393	2073
14	14394-14463	70		

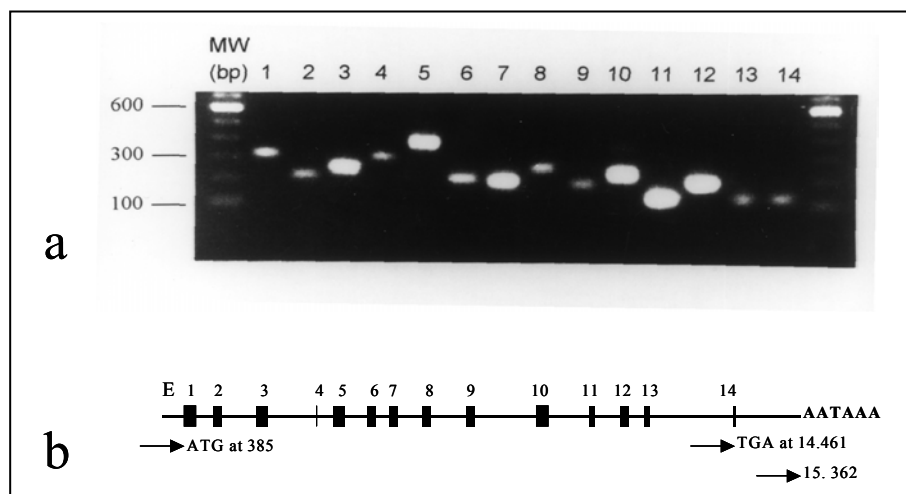


Abb. 4.10: Exon/Intron-Organisation des LOXL4-Gens.

a: Gezeigt sind die mittels PCR amplifizierten LOXL4-Exons (1-14) nach Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung in einem Agarosegel. Geringe Unterschiede gegenüber den in Tabelle 4.1 angegebenen Größen sind durch die Wahl geeigneter Primer begründet.

b: Schematische Darstellung der Exon/Intron-Organisation: Die waagerechte Linie repräsentiert das gesamte LOXL4-Gen und die senkrechten Balken die 14 Exone (E). Die Dicke der Balken ist proportional zur jeweiligen Exon-Länge, sowie die Abstände zwischen den Balken zur Intron-Länge. Signifikante Positionen sind noch einmal verdeutlicht: Startcodon ATG an Position 385, Stopcodon TGA an Position 14.461 und Polyadenylierungssignal AATAAA an Position 15.362.

4.9.2 Vergleichende Analyse der Exonsequenzen des LOXL4-Gens

Da in vorherigen Untersuchungen bereits eine Korrelation zwischen dem LOXL4-mRNA-Expressionslevel und der Invasivität von Kopf-Hals-Karzinomen demonstriert werden konnte (siehe 4.7), wies das LOXL4-Gen typische Merkmale eines Onkogens auf. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, werden Onkogene in den meisten Fällen infolge einer Mutation überexprimiert, und codieren dann für ein Protein, dessen Struktur und Funktion gegenüber dem „normalen“ Protein verändert sind.

Um das LOXL4-Gen in Plattenepithelkarzinomzellen auf etwaige Mutationen zu überprüfen, die mit Veränderungen des Proteins assoziiert sein könnten, wurden seine 14 Exone mittels PCR unter Verwendung von genomischer DNA aus UT-SCC-19A-Zellen amplifiziert. Es wurden dafür die gleichen Primer verwendet, die bereits bei der vorangegangenen Aufklärung der Exon/Intron-Organisation eingesetzt worden waren. Nach Sequenzierung der PCR-Produkte und Vergleich mit den Exonsequenzen des gesunden Zelltyps, konnte in den Tumorzellen sowohl in Exon 5 an Position 4.317 als auch in Exon 10 an Position 9.723 eine Punktmutation (siehe Abb. 4.11) nachgewiesen werden, die sich bei zweimaliger Wiederholung der gleichen PCR bestätigten.

gesunder Zelltyp (WT):	Exon 5: 5`-...TGGCATG <u>CAC</u> GCTGT...-3`
	His
Tumorzelle (MU):	Exon 5: 5`-...TGGCATG <u>CAT</u> GCTGT...-3`
gesunder Zelltyp (WT):	Exon 10: 5`-...GTCTG <u>CGG</u> ATCACAT...-3`
	Ala
Tumorzelle (MU):	Exon 10: 5`-...GTCTG <u>CAG</u> ATCACAT...-3`

Abb. 4.11: Punktmutationen in Exon 5 (Position 4317) und Exon 10 (Position 9723) des LOXL4-Gens.

Die unmutierte Wildtypsequenz (WT) wird von gesunden epithelialen Schleimhautzellen, die mutierte Sequenz (MU) von Plattenepithelkarzinomzellen des oberen Aerodigestivtraktes repräsentiert.

Das von der Mutation betroffene Aminosäurecodon in Exon 5 transversiert von CAC (unmutierte Form=Wildtyp) zu CAT (Mutante), was laut Literatur beides für Histidin (His) codiert (KOOLMAN und RÖHM, 1997). Die Veränderung des Codons in Exon 10 von GCG (Wildtyp) zu GCA (Mutante) bewirkt ebenfalls keinen Aminosäure-Austausch, beide Codons codieren für Alanin (Ala). Aus diesem Grund war anzunehmen, dass beide Punktmutationen in der codierenden Sequenz des LOXL4-Gens in Tumorzellen als sog. „stille Mutationen“ keine verändernde Auswirkung auf das Protein haben.

4.10 Bestimmung des Signalpeptids des LOXL4-Enzyms

Die bereits von MÄKI *et al.* (2001) veröffentlichte Aminosäuresequenz des LOXL4-Enzyms konnte nach Übersetzung der Basentriplets der zuvor ermittelten Exons bestätigt werden (Abb. 4.12).

1-44	MAWSPPATLFLFLLLLGQPPSRPQSLGTTKRLRLVGPESKPEEG
45-102	RLEVLHQGWGTVCDDNFAIQEATVACRQLGFEEAALTWAHSAKYGGEGPIWLDNVRC
103-160	VGTESSLDQCGSNGWGVSDCSHSEDVGVICHPRRHRGYLSETVSNALGPQGRRLLEEV
161-218	LKPILASAKQHSPVTEGAVEVKYEGHWRQVCDQGWMTMNSRVVCGMLGFPSEVPVDSH
219-276	YYRKVWDLKMRDPKSRLKSLTNKNSFWIHQVTCLGTEPHMANCQVQVAPARGKLRPAC
277-334	PGGMHAVVSCVAGPHFRPPKTKPQRKGSWAEPRVRLRSGAQVGEGRVEVLMNRQWGT
335-392	VCDHRWNLISASVVCRLGFGSAREALFGARLGQGLGPIHLSEVRCRGYERTLSDCPA
393-450	LEGSQNGCQHENDAAVRCNVPNMGFQNVRLAGGRIPEEGLLEVQVEVNGVPRWGSVC
451-508	SENWGLTEAMVACRQLGLGFAIHAYKETWFWSGTPRAQEVVMGGVRCSTELALQQCQ
509-566	RHGPVHCSHGGGRFLAGVSCMDSAPDLMNTQLAQETAYLEDRLPSQLYCAHEENCLS
567-624	KSADHMDWPYGYRRLRFSTQIYNLGRDTRPKTGRDSWVWHQCHRHYHSIEVFTHYD
625-682	LLTLNGSKVAEGHKASFCELTNCPTGLQRRYACANFGEQGVTVGCWDTYRHDIDCQW
683-740	VDITDVGPNGYIFQVIVNPHHEVAESDFSNNMLQCRCKYDGHVWLHNCHTGNSYPAN
741-756	AELSLEQEQLRNNLI

Abb. 4.12: Aminosäure-Sequenz von LOXL4.

Die aus 756 Aminosäuren bestehende Sequenz wurde anschließend mit einem computergestützten Vorhersage-Algorithmus bearbeitet, um Rückschlüsse auf die Physiologie des LOXL4-Enzyms zu ziehen. Unter Verwendung des Programms „SignalP prediction“ (NIELSEN *et al.*, 1997) ließ sich ein N-terminales Signalpeptid von 24 Aminosäuren detektieren (Abb. 4.13), welches nicht zum reifen Polypeptid gehört. Dies verdeutlicht die Verwandtschaft von LOXL4 zu anderen Isoformen wie z.B. LOXL3, das ebenfalls ein Signalpeptid am N-Terminus trägt (MÄKI *et al.*, 2001).

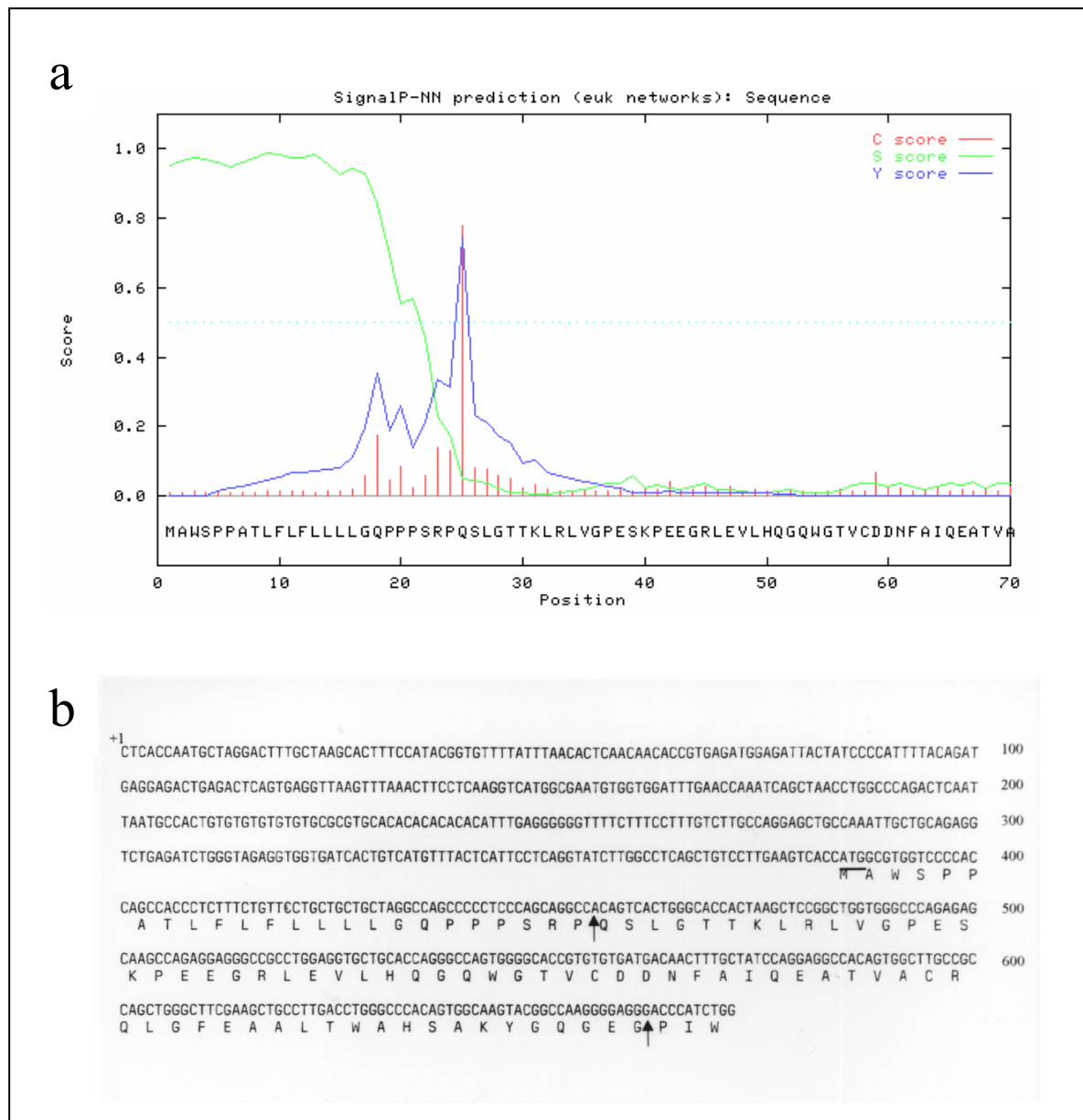


Abb. 4.13: Signalpeptid des LOXL4-Gens.

a) Mit Hilfe des Vorhersage-Algorithmus „SignalP prediction“ konnte die potentielle Schnittstelle des N-terminalen Signalpeptids von LOXL4 (höchste vertikale Linie) bestimmt werden. Die Daten beruhen auf CBS (Center for Biological Sequence)-Analysen unter Verwendung von Datenbankinformationen über Signalsequenzen bekannter Proteine. b) Gezeigt ist die DNA-Sequenz der 5'UTR und des Exons 1 von LOXL4. Der DNA-Sequenz von Exon 1 ist die Aminosäuresequenz gegenübergestellt. Das Startcodon für die Translation (ATG, Pos. 385-387) ist unterstrichen. Der Pfeil an Position 557 deutet die Schnittstelle für die Abspaltung des Signalpeptids an, die zuvor mit Hilfe eines Vorhersage-Algorithmus ermittelt wurde. Der zweite Pfeil an Position 662 zeigt das Ende des Exons 1 an.

4.11 Analyse der regulatorischen Region des LOXL4-Gens

4.11.1 Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des LOXL4-Gens

Die zuvor durchgeführte Nuclear-Run-On-Analyse (siehe 4.8) hatte gezeigt, dass die Ursache für die Überexpression der LOXL4-mRNA in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs auf Ebene der Transkriptions-Kontrolle zu suchen war. Da die regulatorischen Mechanismen dieser Kontroll-Ebene hauptsächlich im 5'-flankierenden Bereich eines Gens wirken, galt es, die entsprechende Region des LOXL4-Gens vergleichend im malignen und gesunden Zelltyp zu untersuchen. Um hierbei zunächst auf etwaige Mutationen aufmerksam zu werden, die die Regulation des LOXL4-Gens unterschiedlich beeinflussen könnten, wurde zunächst die Sequenz der 5'-flankierenden Region in den beiden Zelltypen ermittelt.

Mit Hilfe der Datenbanksequenz Acc.No. AL139241, die schon zuvor zur Aufklärung der Exon/Intron-Organisation herangezogen worden war, wurde der prospektive Promotorbereich des LOXL4-Gens (Abb. 4.14) ausfindig gemacht und mit Hilfe spezifischer Primer abschnittsweise von Position +384 bis -2554 durch PCR amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte in jeweils 2 parallelen Ansätzen: einem mit genomischer DNA aus UT-SCC-19A-Zellen und einem mit genomischer DNA gesunder epithelialer Schleimhautzellen als Template. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert und mit dem entsprechenden Abschnitt der Datenbanksequenz verglichen, wodurch die prospektive Promotorsequenz für beide Zellen verifiziert werden konnte (Abb. 4.14). Bei dreimaliger Wiederholung der Amplifikationen und des Sequenzvergleichs konnte jedes Mal eine 100%ige Übereinstimmung der 5'-flankierenden Sequenz des LOXL4-Gens aus Tumorzellen mit der des gesunden Zelltyps und der Datenbanksequenz nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist eine durch Mutationen hervorgerufene Veränderung der Transkriptions-Kontrolle auszuschließen.

bp						
-968			[...]	acctctttcc	ctctttccta	atcctcttct
-938	ctgtatctcg	aatgccctt	ttctcaccca	ggagaatctt	attgcccga	taaggctcag
-878	gtaagtgtc	ccttcttga	aaggcttccc	taattcttct	tgcttgagct	tcatgaaggt
-818	agggagggtg	ttcgatgtct	taatttctgt	gtcccagcac	ctggcctgaa	gcaagtattc
-758	caaaaatgtg	tattgaatct	acatgaatca	tacgcctaga	tgatgtgag	gctatcacag
-698	ggatccaag	ctgcaggagg	gatccagatg	atatgtggtt	ccatctctc	actttagaaa
-638	taaagagtca	gggccgggca	cagtggctca	cacctgtaat	cccgcactt	tgggaggcca
-578	aggcggtgg	atcacgaggt	caggagtcca	agaccagtgt	ggccaagatg	gtgaaacccc
-518	gtcttacta	cagatacaaa	aaaattagct	gggcgtggtg	gtgggcgcct	gtaatccccag
-458	ctactcagga	ggatgaggca	gagaattgct	taaacctggg	aggcggtggt	tgagtgcagc
-398	tgagtgtgca	gcactgcagt	ccagcctggg	cgacagagag	agactctgtc	tcgaaaaaaa
-338	aaaaaaaaag	aaagaaagaa	agaaaaaaga	aagaaagagt	caggacctag	agagttgaag
-278	agactgtccc	aagccatgca	gccaatgagt	gggtgagtcc	ttgatgcca	tctaatagcc
-218	ctttctgctc	cagcctcca	tgtgccttct	agggtgaaggc	ggcacttcac	acatttgatt
-158	agggtgctag	gaacatcaga	agggtgtggc	agtgtccctg	gggtagatag	tcttgacctg
-98	agggcacctt	gggggcatcc	ccgtgactca	aatggtggac	cacctgtctt	gcctacacat
-38	aagattttag	gtgtataaga	gctgctgttt	attgtgtact	caccaatgct	aggactttgc
+32	taagcacttt	[...]				

Abb. 4.14: Ausschnitt der 5'flankierenden Sequenz des LOXL4-Gens (Pos. -968 - +41).

Hinreichende Analysen dieser Region zeigten keinen Sequenzunterschied zwischen Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf-Hals-Region und dem entsprechenden gesunden Zelltyp. Die Transkriptions-Initiationsstelle (Position +1) ist grau unterlegt.

4.11.2 Nachweis potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector V2.2“ konnten in der 5'flankierenden Region des LOXL4-Gens von Position -398 bis +15 verschiedene potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Tabelle 4.2), wodurch ein Zusammenhang dieser Region mit der Regulation der Transkription deutlich wird.

Tabelle 4.2: Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im LOXL4-Promotor.

bp						
-398	tgagattgca	gcactgcagt	ccagcctggg	cgacagagag	agactctgtc	tcgaaaaaaa
-338	aaaaaaaaag	<u>aa</u> agaaagaa	agaaaaaaga	<u>a</u> agaaagagt	caggacctag	agagttgaag
-278	agacttgccc	aagccatgca	<u>gcca</u> atgagt	ggtggagtcc	ttgatgccc	tctaatagcc
-218	ctttctgctc	cagccttcca	<u>tgt</u> gccttct	aggtgaaggc	ggcacttcac	acatttgatt
-158	aggggtgctag	<u>ga</u> acatcaga	aggtggtggc	agtgtccctg	gggtagatag	tcttgacctg
-98	aggggcacct	gggggcatcc	ccgtgactca	aatgggtggac	cacctgtct	gcctacacat
-38	aagatttag	gtgtataaga	gctgctgttt	attgtgtact	caccaatgct	agg[...]

Position im LOXL4-Promotor (bp)	Targetsequenz	Transkriptionsfaktor	Synonym
(-25) – (-21)	TATAA	TBP	
(-75) – (-69)	TGACTCA	AP-1	AP1 ; Fos/Jun
(-105) – (-102)	TGAC	ER-alpha	estrogen receptor; NR3A1
(-113) – (-110)	GATA	Lmo2	LIM-only protein 2 ; RBTN2 ; Rhombotin-2
(-113) – (-110)	GATA	GATA-1	GF-1; NF-E1
(-149) – (-146)	GGAA	RFX1	EF-C; enhancer factor C
(-181) – (-178)	GGCG	GC box element	
(-200) – (-197)	CATG	POU2F1	Oct-1; octamer-binding factor; oct-B1A; oct-B1B
(-257) – (-253)	CCAAT	CP1	CBF
(-310) – (-307)	GAAA	IRF2	
(-329) – (-326)	GAAA	IRF1	

Der obere Teil der Tabelle zeigt die 5'-flankierende Sequenz des LOXL4-Gens von Position –398 bis +15. Die Transkriptions-Initiationsstelle (Position +1) ist grau unterlegt. Die ermittelten potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen. Der untere Teil der Tabelle ordnet den ermittelten Targetsequenzen entsprechende Transkriptionsfaktoren zu.

4.11.3 Analyse einzelner Promotorfragmente des LOXL4-Gens mit Hilfe von Reportergenkonstrukten

Um einen Überblick zu erhalten, welche Regionen des LOXL4-Promotors für die differentielle Expression des entsprechenden mRNA-Moleküls verantwortlich sein könnten, galt es entsprechende Analysen mit Hilfe von Reportergenkonstrukten durchzuführen. Zur Herstellung dieser Konstrukte wurden zunächst 9 einzelne Abschnitte des LOXL4-Promotors (bezeichnet mit REP1 bis REP9; Tabelle 4.3) aus dem Bereich von Position +15 bis –348 durch Annealing synthetisch generierter Oligonucleotide erzeugt. Da in den meisten Fällen eine Transkriptionsbeeinflussung durch Transkriptionsfaktoren verursacht wird, waren die Fragmente mit Ausnahme der Abschnitte REP2 und REP8 derart ausgewählt worden, dass in ihnen Targetsequenzen lokalisiert waren.

Tabelle 4.3: LOXL4- Promotorabschnitte, die mittels Reportergenkonstrukten untersucht wurden.

Position im LOXL4-Promotor	Bezeichnung des Promotorabschnitts	Sequenz des Promotorabschnitts 5'→3' (Targetsequenz potentiell bindender Transkriptionsfaktoren farblich hervorgehoben)	potentiell bindende Transkriptions- faktoren
(-30) – 15	REP1	AGGTG TATA AGAGCTGCTGTT TATTGTGTACTACCAATGCT AGG	TBP
(-45) – (-31)	REP2	TACACATAAGATTT	_____
(-74) – (-46)	REP3	TGACTCA AATGGTGGACCACC TCGTCTGCC	AP-1
(-115) – (-75)	REP4	TA GAT AGTCT TGAC CTGAGGG CACCCTGGGGGCATCCCCGT	ER-alpha; Lmo2; GATA-1
(-167) – (-116)	REP5	CATTGATTAGGGTGCTA GGA ACAT CAGAAGGTGGTGGCAG TGTCCTGGGG	RFX1

(-208) – (-168)	REP6	CAGCCTTC	CAT	TGCCTTCTA	GC box element;
		GGTGAA	GGCG	GCACTTCACA	POU2F1
(-259) – (-169)	REP7	AG	CCAAT	GAGTGGTGGAGTC	CP1
		CTTGATGCCC	ATCTAAAGCCC		
		TTTCTGCTC			
(-302) – (-260)	REP8	GAGTCAGGACCTAGAGAGTT			
		GAAGAGACTTGCCCAAGCCAT			
		GC			
(-348) – (-303)	REP9	TCGAAAAAAAAAAAAAAAAA	GA		IRF2; IRF1
		AA	GAAAGAAAGAAAAAAAA	GAAA	
		GAAA			

Zur besseren Veranschaulichung ist die Anordnung dieser LOXL4-Promotorabschnitte inklusive der enthaltenen Targetsequenzen in Abb. 4.15 noch einmal graphisch dargestellt.

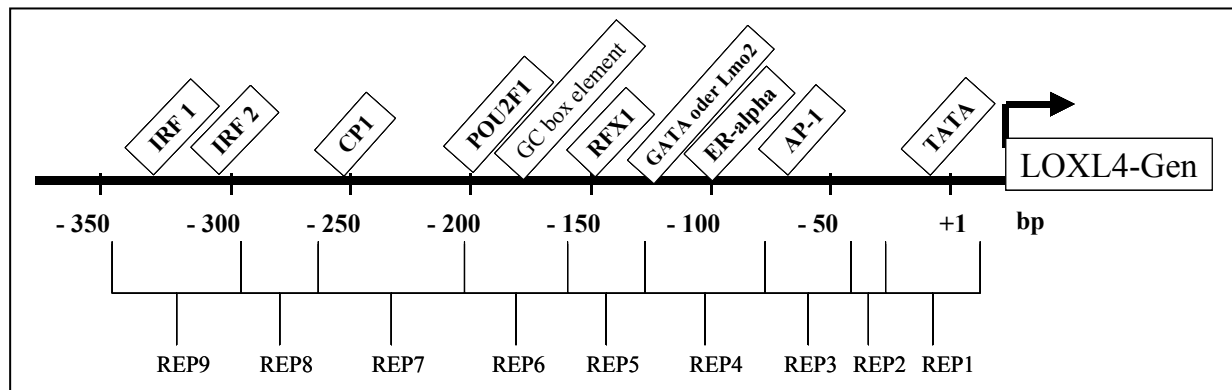


Abb. 4.15: Anordnung einzelner LOXL4-Promotorabschnitte (REPs) inklusive Targetsequenzen für Transkriptionsfaktoren.

Durch Integration der einzelnen Promotorfragmente in den Plasmidvektor pGL3-Enhancer (Promega) wurden die Reporter-genkonstrukte gewonnen. Diese wurden anschließend mittels Lipofectin-vermittelter transienter Transfektion in UT-SCC-19A-Zellen und den entsprechenden gesunden Zelltyp eingeschleust. Zwecks Bestimmung der Transfektionseffizienz wurde der pRL-TK-Plasmidvektor co-transfiziert. Jedes Reporter-genkonstrukt wurde insgesamt 3x in jeden Zelltyp

transfiziert und die Zellen nach 48h einem DLA unterzogen. Die DLA-Werte wurden wie unter 3.17.5 beschrieben ausgewertet. Der Vergleich der Enddaten eines Konstruktes aus den verschiedenen Zelltypen gibt indirekt darüber Aufschluß, in wie weit der jeweilige Promotorabschnitt zu einer Beeinflussung der Transkription des LOXL4-Gens führt und ob sich diese innerhalb der malignen und gesunden Zellen unterscheidet. Abb. 4.16 zeigt eine graphische Übersicht über die ermittelten Daten durch Darstellung in einem Säulendiagramm.

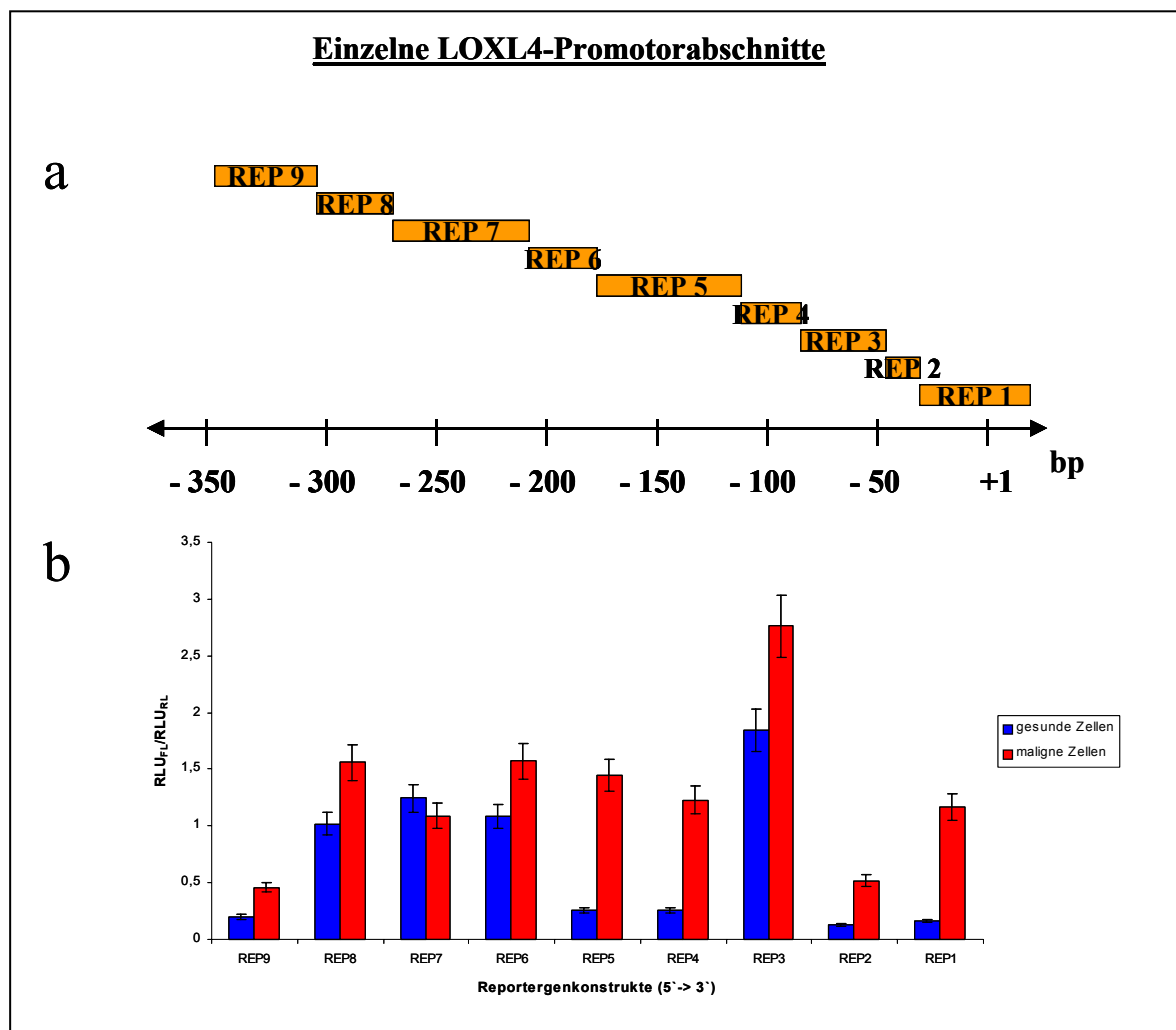


Abb. 4.16: Vergleichende Untersuchung einzelner LOXL4-Promotorabschnitte in Reportergenkonstrukten.

a) Schematische Darstellung der Anordnung und Positionen der im DLA untersuchten LOXL4-Promotorabschnitte. b) Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der DLA-Messungen der Reportergenkonstrukte REP1 bis REP 9 im gesunden Zelltyp (blau) und in UT-SCC-19A-Zellen (rot). Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Das Säulendiagramm zeigt, daß für alle untersuchten LOXL4-Promotorfragmente mit Ausnahme von REP 7 eine höhere Transkriptionsaktivität in malignen gegenüber gesunden Zellen nachgewiesen wurde. Insgesamt ist die Tendenz des Transkriptionseinflusses in beiden Zelltypen wiederum mit Ausnahme von REP 7 jedoch sehr ähnlich. So zeigt in beiden Zelltypen die Region REP 3 das stärkste Transkriptionsaktivierungspotential. Die niedrigste Aktivierung bewirkt in den Tumorzellen der Abschnitt REP 9 und in den gesunden Zellen REP 2.

In der differentiellen Bindung von Transkriptionsfaktoren und in deren unterschiedlichen Interaktionen zueinander und mit basalen Transkriptionsfaktoren ist eine häufige Ursache für Genexpressionsunterschiede zwischen zwei Zelltypen zu sehen. Aus diesem Grund werden die hier dargestellten DLA-Ergebnisse in Assoziation mit den DLA-Ergebnissen der zusammenhängenden LOXL4-Promotorabschnitte (siehe 4.11.2) und den Ergebnissen der EMSA-Analyse unter 4.12 detaillierter beschrieben.

4.11.4 Analyse zusammenhängender Promotorfragmente des LOXL4-Gens mit Hilfe von Reportergenkonstrukten

Analog der zuvor beschriebenen Untersuchung wurden die gleichen, jedoch hintereinandergereihten, stets vom Transkriptionsstart ausgehenden LOXL4-Promotorfragmente im DLA analysiert (Abb. 4.17).

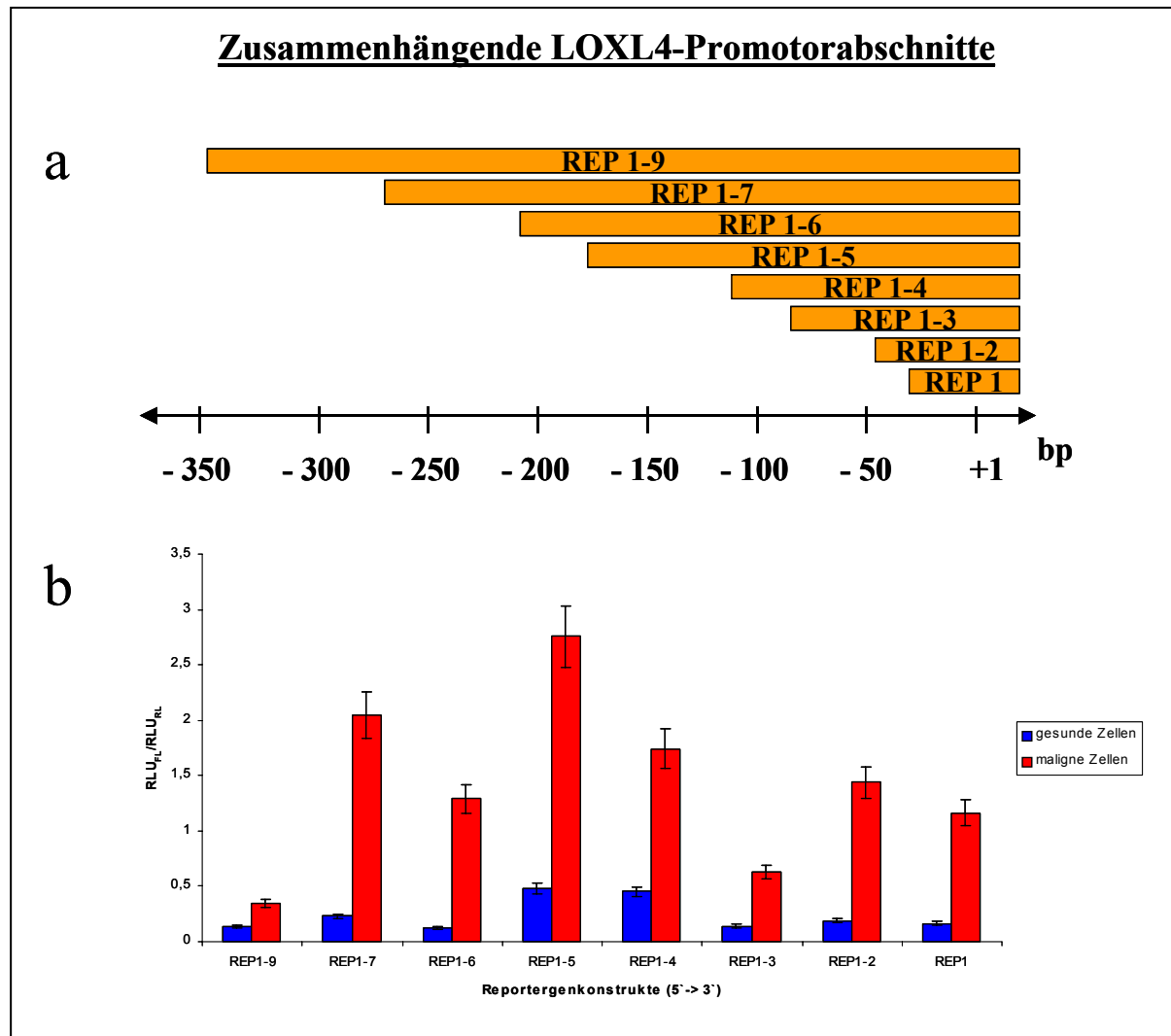


Abb. 4.17: Vergleichende Untersuchung zusammenhängender LOXL4-Promotorabschnitte in Reportergenkonstrukten.

a) Schematische Darstellung der Anordnung und Positionen der im DLA untersuchten LOXL4-Promotorabschnitte. b) Das Säulendiagramm zeigt die Ergebnisse der DLA-Messungen der zusammenhängenden LOXL4-Promotorabschnitte REP1-2, REP1-3, ..., REP 1-7, REP1-9 in UT-SCC-19A-Zellen (rot) und gesunden epithelialen Schleimhautzellen (blau). Einzelheiten sind im Text beschrieben.

Wie in Abb. 4.17 demonstriert, wurde für alle Abschnitte ein transkriptionsverstärkender Einfluß in UT-SCC-19A-Zellen gegenüber dem gesunden Zelltyp nachgewiesen. Die Tendenz des Einflusses ist wie bereits bei den einzelnen Fragmenten für beide Zelltypen gleich. Die höchste Transkriptionsaktivierung zeigt der Abschnitt REP 1-5, die niedrigste wurde in Tumorzellen für das Fragment REP 1-9 und in den gesunden Zellen für REP 1-6 ermittelt. Auch diese Daten werden im folgenden Text in Assoziation mit den EMSA-Ergebnissen detaillierter beschrieben.

4.12 DLA-Analysen am LOXL4-Promotor in Assoziation mit EMSA-Untersuchungen

Um einen sinnvollen Einblick in die Regulation des LOXL4-Gens zu erhalten, wurden die Promotor-Analysen mittels Reportergenkonstrukten und DLA (siehe 4.11) mit den Ergebnissen von EMSA-Untersuchungen an den einzelnen LOXL4-Promotorfragmenten im Zusammenhang betrachtet. Zusätzliche EMSAs an den zusammenhängenden Promotorabschnitten konnten aus dem Grund nicht zweckmäßig durchgeführt werden, da die DNA-Fragmente zu lang waren, bzw. zu viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthielten, was zu keinen eindeutig identifizierbaren Bandshifts führte.

(Fortsetzung nächste Seite)

REP 1 und REP 1-2:

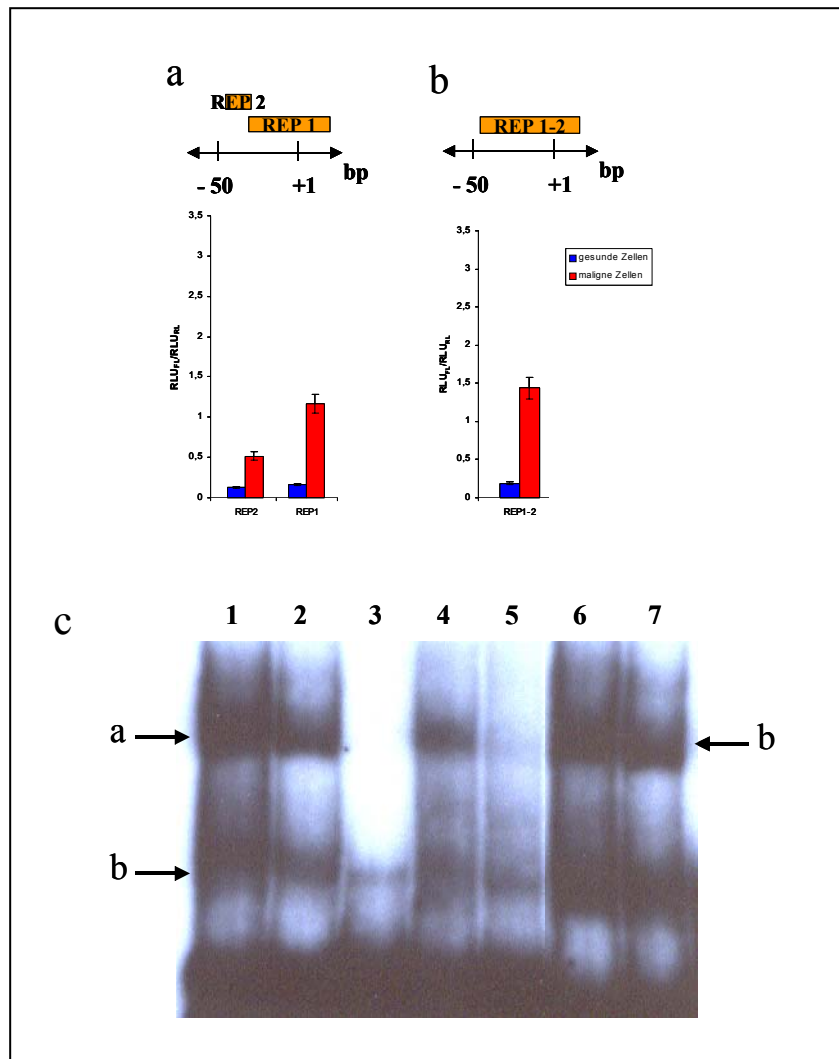


Abb.4.18: DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 1, REP 2 und REP 1-2.

a) DLA für REP 1 und REP 2. b) DLA für REP 1-2. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen. c) EMSA für REP 1-2. 1: EMSA für Tumorzellen; 2: EMSA für gesunde Zellen; 3: Negativkontrolle; 4: spezifischer Kompetitionstest/ Tumorzellen; 5: spezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen; 6: unspezifischer Kompetitionstest/Tumorzellen; 7: unspezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen. Die Pfeile a und b am linken Rand kennzeichnen Bandshifts in den Spuren 1 und 2. Der Bandshift a in gesunden Zellen wird im spezifischen Kompetitionstest vollständig kompetitiert (Spur 5), der Bandshift a in Tumorzellen dagegen nur unvollständig (Spur 4). Im unspezifischen Kompetitionstest (Spuren 6 und 7) erscheinen beide Bandshifts a in ihrer Ausgangsintensität wieder, was die Spezifität der Protein-DNA-Bindung beweist. Da Bandshift b auch in der Negativkontrolle erscheint, wurde er nicht durch Protein-DNA-Bindung hervorgerufen.

Für den Abschnitt REP 1, in dem die TATA-Box lokalisiert war, konnten im DLA Werte von $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,2$ in Tumorzellen und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,2$ in gesunden Zellen ermittelt werden (siehe Abb. 4.18), d.h. dieser Abschnitt aktiviert die Transkription in malignen Zellen um das 6fache gegenüber dem gesunden Zelltyp. Die entsprechenden DLA-Daten für den Abschnitt REP 2 betragen für Tumorzellen

$RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,5$ und für gesunde Zellen $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,1$, die damit jeweils niedriger waren als für das vorherige Promotorfragment. Bei der Zusammenfassung beider Fragmente zu REP 1-2 konnten mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,4$ und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,1$ DLA-Werte von der gleichen Größenordnung wie für REP 1 gemessen werden.

REP 3 und REP 1-3:

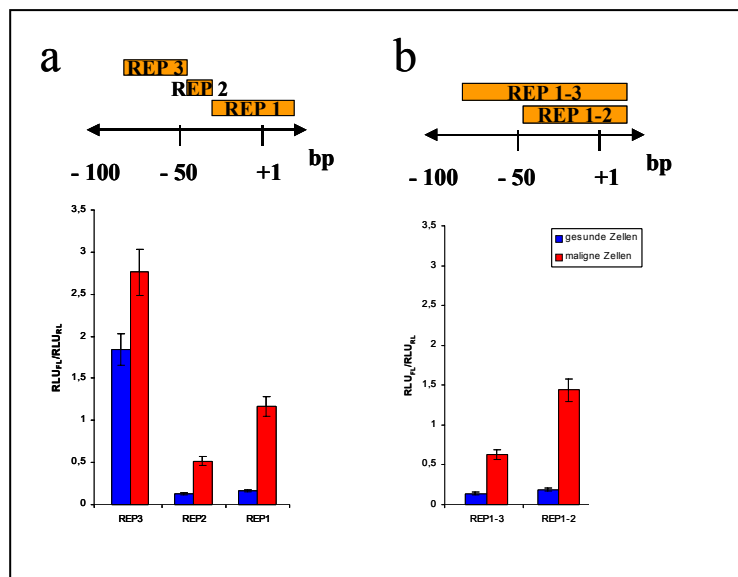


Abb. 4.19: DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 3 und REP 1-3.

a) DLA für REP 1, 2 und 3 b) DLA für REP 1-2 und 1-3. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen.

Im LOXL4-Promotorabschnitt REP 3 wurde mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=2,8$ eine 1,5fach höhere Transkriptionseffizienz in malignen gegenüber gesunden Zellen mittels DLA ermittelt (Abb. 4.19). Die DLA-Daten für den von der Transkriptionsinitiationsstelle ausgehenden Abschnitt REP 1-3 zeigten dem gegenüber mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,6$ für Tumorzellen und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,1$ im gesunden Zelltyp sehr viel niedrigere Werte. Auch verglichen mit dem vorangegangenen Fragment REP 1-2 zeigten die Werte eine Verringerung der Transkriptionseffizienz in beiden Zelltypen, wobei die der malignen Zellen dennoch höher als in den gesunden Zellen blieb. Mittels EMSA-Analyse für das Promotorfragment REP 3, das eine Targetsequenz für den Transkriptionsfaktor AP1 beinhaltet (siehe Abb. 4.15 und Tabelle 4.3), konnte kein sequenzspezifischer Bandshift nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

REP 4 und REP 1-4:

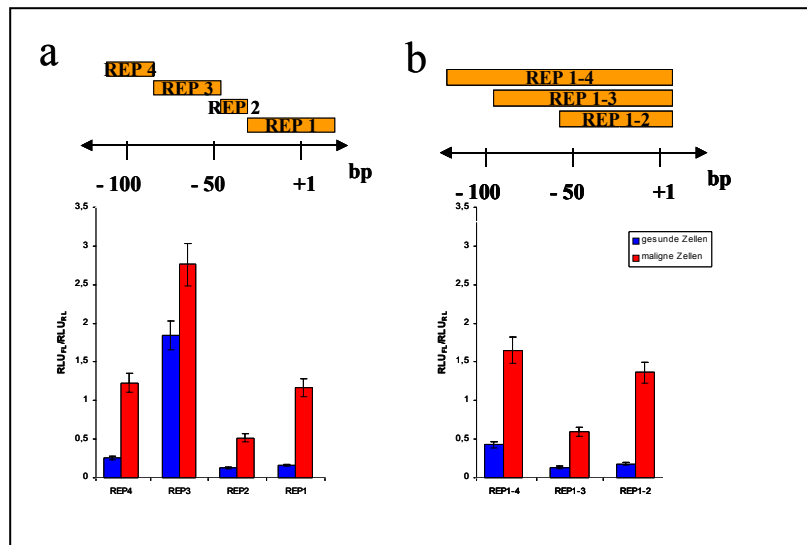


Abb. 4.20: DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 4 und REP 1-4.

a) DLA für REP 1 bis REP 4 b) DLA für REP 1-2 bis REP 1-4. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen.

Im Abschnitt REP 4 konnte mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,2$ erneut eine 4fach höhere Transkriptionsaktivität in malignen gegenüber gesunden Zellen im DLA nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Die DLA-Werte für die zusammenhängenden Abschnitte REP 1-4 lagen demgegenüber mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,7$ für Tumorzellen und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,5$ im gesunden Zelltyp geringfügig höher. Das Verhältnis zwischen der jeweiligen Transkriptionsaktivität in malignen gegenüber gesunden Zellen blieb jedoch gleich. Im Vergleich zum vorherigen Abschnitt REP 1-3 hatte sich das Transkriptionsaktivierungspotential in beiden Zelltypen erhöht. Die EMSA-Untersuchung an REP 4 zeigte wie schon bei REP 3 keinen sequenzspezifischen Bandshift (hier nicht gezeigt).

REP 5 und REP 1-5:

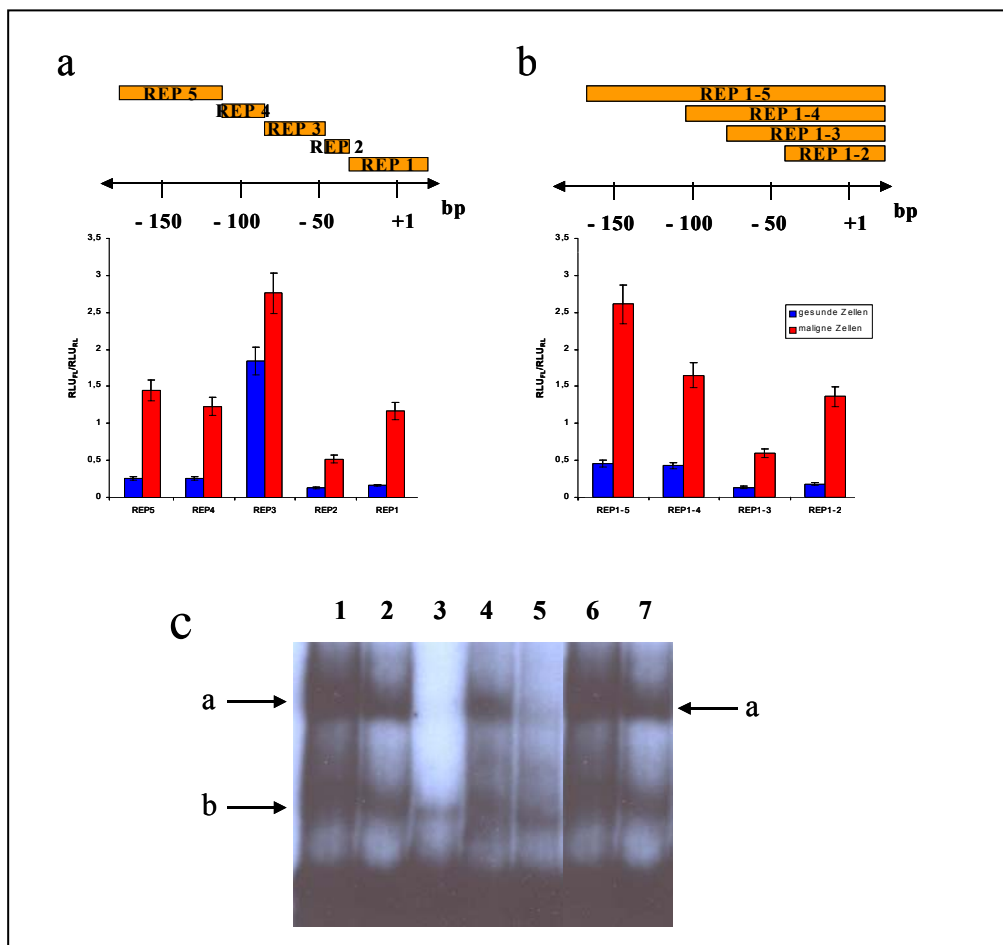


Abb. 4.21: DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 5 und REP 1-5.

a) DLA für REP 1 bis REP 5. b) DLA für REP 1-2 bis REP 1-5. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen. c) EMSA für REP 5. 1: EMSA für Tumorzellen; 2: EMSA für gesunde Zellen; 3: Negativkontrolle; 4: spezifischer Kompetitionstest/ Tumorzellen; 5: spezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen; 6: unspezifischer Kompetitionstest/Tumorzellen; 7: unspezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen. Die Pfeile a und b am linken Rand kennzeichnen Bandshifts in den Spuren 1 und 2. Der Bandshift a wird im spezifischen Kompetitionstest in gesunden Zellen vollständig kompetitiert (Spur 5), in Tumorzellen dagegen nur unvollständig (Spur 4). Im unspezifischen Kompetitionstest (Spuren 6 und 7) erscheinen beide Bandshifts a in ihrer Ausgangsintensität wieder, was die Spezifität der Protein-DNA-Bindung beweist. Da Bandshift b auch in der Negativkontrolle erscheint, wurde er nicht durch Protein-DNA-Bindung hervorgerufen.

Der LOXL4-Promotorabschnitt REP 5 hatte mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,4$ wie alle vorherigen Fragmente ein höheres Transkriptionsaktivierungspotential in malignen Zellen. Die Erhöhung gegenüber gesunden Zellen betrug das 4,6fache. In dem vom Transkriptionsstart ausgehenden Abschnitt REP 1-5 war die Transkriptionsaktivierung für jeden Zelltyp etwa doppelt so hoch wie in dem Einzelfragment REP 5. Im Vergleich zum vorangegangenen Fragment REP 1-4 wies REP 1-5 in Tumorzellen ebenfalls eine Erhöhung der Transkriptionseffizienz auf,

wogegen diejenige in gesunden Zellen nahezu gleich geblieben war. Laut MatInspector-Analyse war im Promotorfragment REP 5 die Targetsequenz für den Transkriptionsfaktor RFX1 lokalisiert. Auch mittels EMSA konnte in diesem Abschnitt für beide Zelltypen die Bindung eines Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. Die Bandshifts lagen zwar auf gleicher Höhe, jedoch wies die Bande in Tumorzellen eine wesentlich stärkere Intensität auf und ließ sich bei einem 50fachen Überschuß an einem unmarkierten sequenzgleichen Oligonucleotid schlechter kompetitieren. Dennoch verringerte sich hier die Bandenintensität deutlich und gewann im unspezifischen Competitionstest ihre ursprüngliche Stärke wieder, was die Sequenzspezifität der Protein-DNA-Bindung beweist.

REP 6 und REP 1-6:

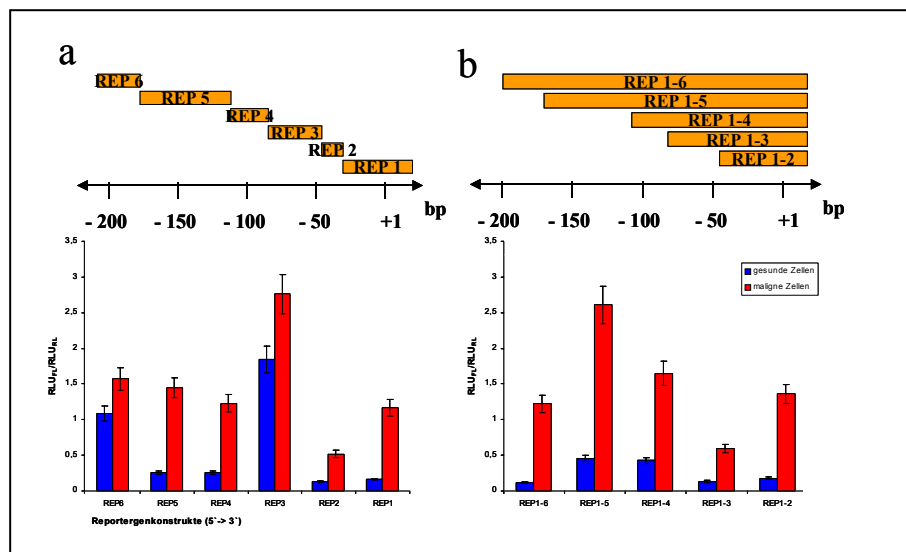


Abb. 4.22: DLA für die LOXL4-Promotorregionen REP 6 und REP 1-6.

a) DLA für REP 1 bis REP 6. b) DLA für REP 1-2 bis REP 1-6. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen.

Der einzelne Promotorabschnitt REP 6 wies im DLA mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,6$ für Tumorzellen ein etwa 1,4fach höheres Transkriptionsaktivierungspotential gegenüber dem gesunden Zelltyp auf. Der vom Transkriptionsstart ausgehende Abschnitt REP 1-6 zeigte in Tumorzellen mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,3$ eine ähnlich hohe Transkriptionseffizienz wie in REP 6, wogegen für die gesunden Zellen ein etwa 10fach geringerer Wert nachgewiesen wurde. Im Vergleich zum vorangegangenen

Abschnitt REP 1-5 hatte sich die Transkriptionsaktivität im malignen Zelltyp um etwa die Hälfte verringert, im gesunden Zelltyp sogar um das 5fache. Für das Promotorfragment REP 5, in dem Bindungsstellen für ER-alpha, Lmo2 und GATA-1 detektiert worden waren (siehe Abb. 4.15 und Tabelle 4.3), konnte jedoch mittels EMSA kein sequenzspezifischer Bandshift für beide Zelltypen nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

REP 7 und REP 1-7:

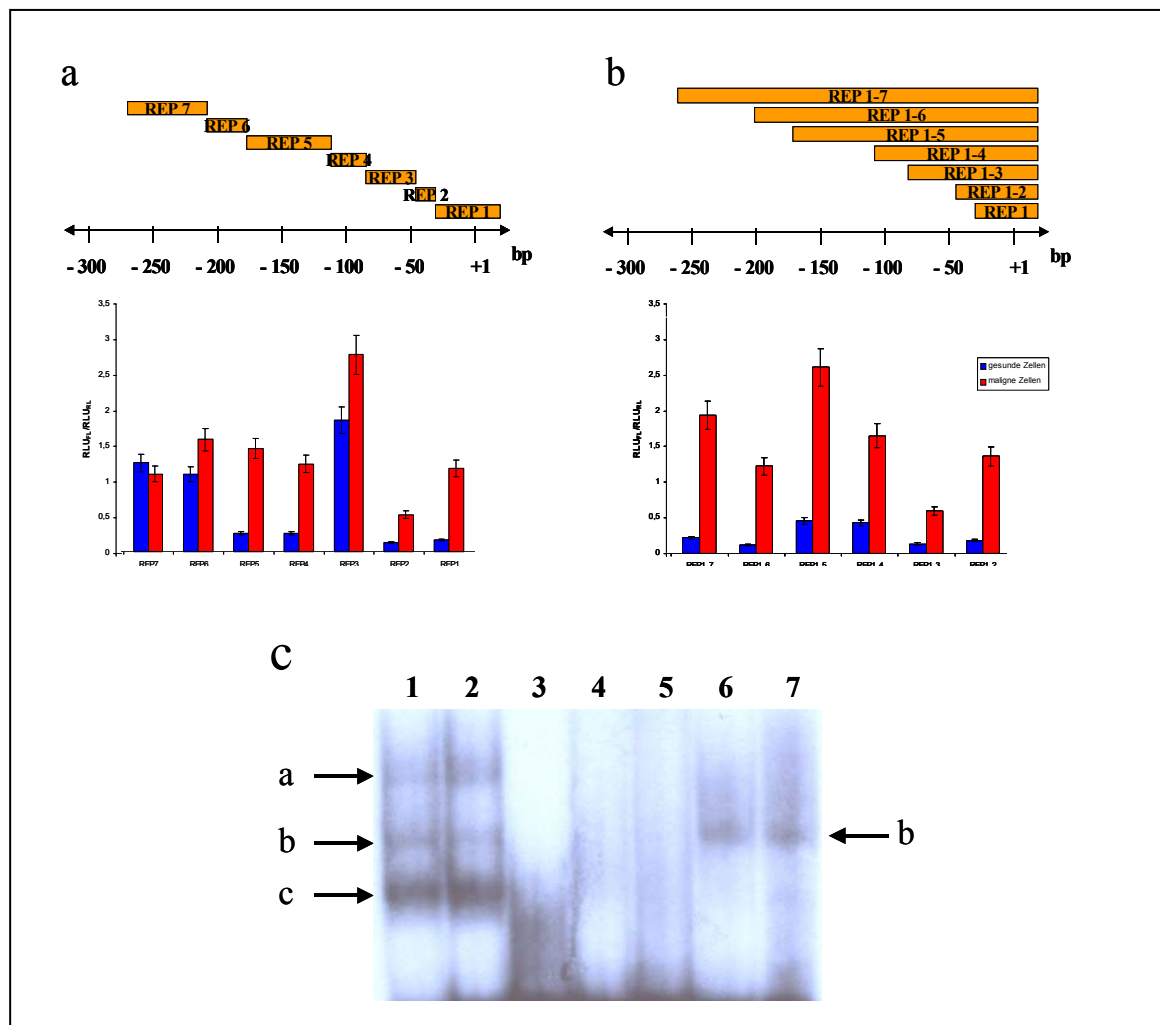


Abb. 4.23: DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 7 und REP 1-7.

a) DLA für REP 1 bis REP 7. b) DLA für REP 1-2 bis REP 1-7. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen. c) EMSA für REP 7. 1: EMSA für Tumorzellen; 2: EMSA für gesunde Zellen; 3: Negativkontrolle; 4: spezifischer Kompetitionstest/ Tumorzellen; 5: spezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen; 6: unspezifischer Kompetitionstest/Tumorzellen; 7: unspezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen. Die Pfeile a, b und c am linken Rand kennzeichnen Bandshifts in den Spuren 1 und 2. Alle Bandshifts werden im spezifischen Kompetitionstest vollständig kompetitiert (Spur 4 und 5). Im unspezifischen Kompetitionstest (Spuren 6 und 7) erscheint lediglich Bandshift b in beiden Zelltypen wieder, was die Spezifität dieser Protein-DNA-Bindung beweist. Die Bandshifts a und c werden dagegen nicht erneut sichtbar, sie sind daher auf unspezifische Protein-DNA-Bindungen zurückzuführen.

Der LOXL4-Promotorabschnitt REP 7 zeigt im DLA mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,1$ in Tumorzellen gegenüber $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,2$ in gesunden Zellen eine geringfügig niedrigere Transkriptionseffizienz. Für die zusammenhängende Promotorregion REP 1-7 konnte jedoch wie in den vorherigen Abschnitten eine sehr viel höhere Transkriptionsaktivität im malignen gegenüber dem gesunden Zelltyp ermittelt werden, die mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=2$ um das ca. 10fache erhöht war. Auch im Vergleich zu dem nächst kürzeren Fragment REP 1-5 lag hier eine Transkriptionsaktivierung vor, die beide Zelltypen betraf. In der EMSA wurde für beide Zelltypen gleichermaßen die Bindung eines Transkriptionsfaktors nachgewiesen, bei dem es sich basierend auf die MatInspector-Analyse (siehe Abb. 4.15) vermutlich um CP1 handelt. Die Sequenzspezifität der Protein-DNA-Bindung konnte durch das Verschwinden der Banden im spezifischen und das Wiedererscheinen der Banden im unspezifischen Konkurrenztest bewiesen werden (Abb. 4.23).

REP 8, REP 9 und REP 1-9:

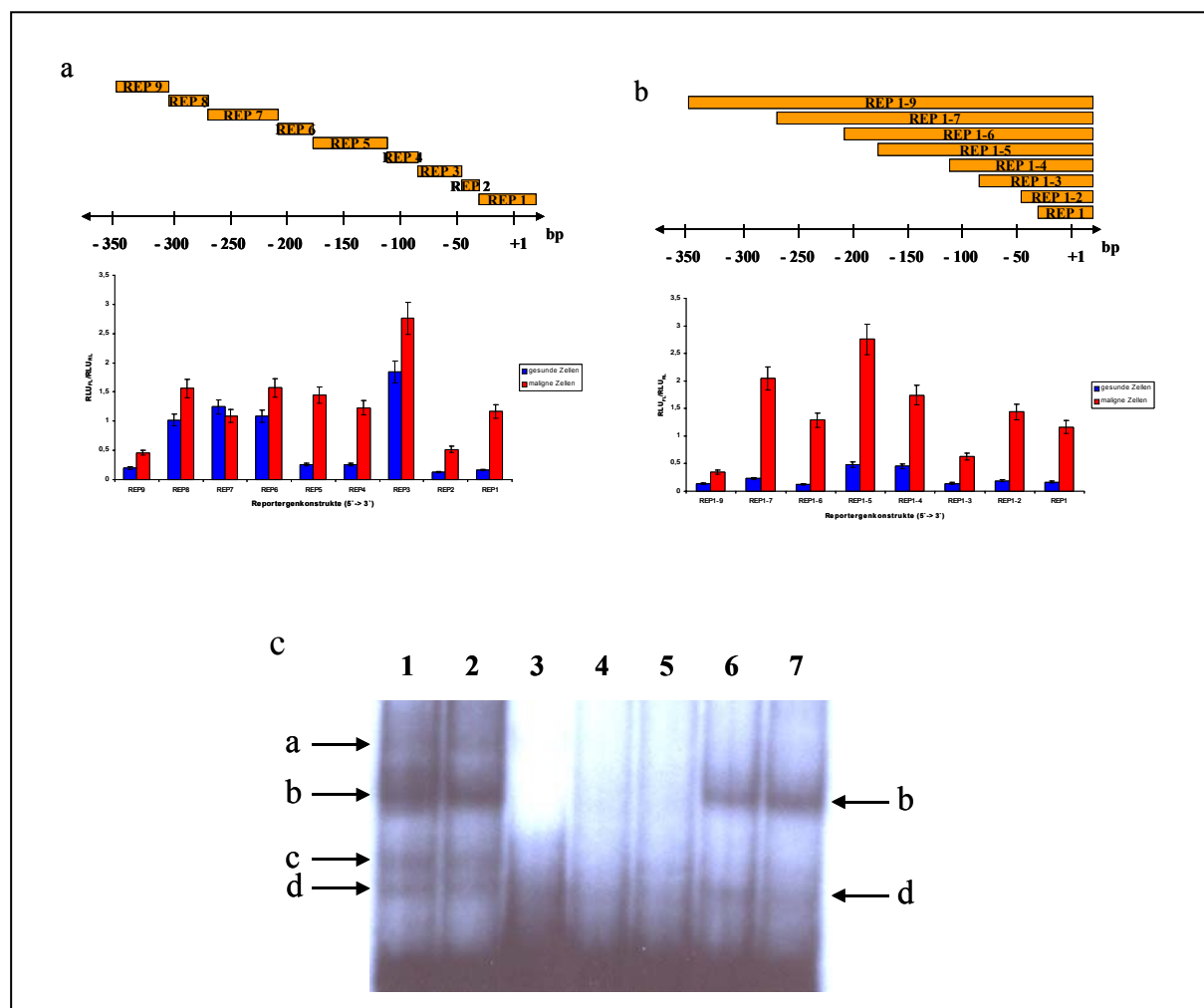


Abb. 4.24: DLA und EMSA für die LOXL4-Promotorregionen REP 8, REP 9 und REP 1-9.

a) DLA für REP 1 bis REP 9. b) DLA für REP 1-2 bis REP 1-9. Rote Säulen=Tumorzellen, blaue Säulen=gesunde Zellen. c) EMSA für REP 8-9. 1: EMSA für Tumorzellen; 2: EMSA für gesunde Zellen; 3: Negativkontrolle; 4: spezifischer Kompetitionstest/ Tumorzellen; 5: spezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen; 6: unspezifischer Kompetitionstest/Tumorzellen; 7: unspezifischer Kompetitionstest/gesunde Zellen. Die Pfeile a, b, c und d am linken Rand kennzeichnen Bandshifts in den Spuren 1 und 2. Alle Bandshifts werden im spezifischen Kompetitionstest vollständig kompetitiert (Spur 4 und 5). Im unspezifischen Kompetitionstest (Spuren 6 und 7) erscheinen lediglich Bandshift b und d in beiden Zelltypen wieder, was die Spezifität dieser Protein-DNA-Bindungen beweist. Die Bandshifts a und c werden dagegen nicht erneut sichtbar, sie sind daher auf unspezifische Protein-DNA-Bindungen zurückzuführen.

Für den LOXL4-Promotorabschnitt REP 8 konnte im DLA mit $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1,6$ in Karzinomzellen gegenüber $RLU_{FL}/RLU_{RL}=1$ im gesunden Zelltyp ein geringfügig höheres Transkriptionsaktivierungspotential nachgewiesen werden. Im nachfolgenden Einzelfragment REP 9 nahm demgegenüber die Transkriptionseffizienz stark ab bis zu Werten von $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,5$ im malignen und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,2$ im gesunden Zelltyp. In dem vom Transkriptionsstart ausgehenden Promotorabschnitt REP 1-9 konnte ebenfalls im Vergleich zu REP 1-7 ein Rückgang der Transkriptionseffizienz nachgewiesen werden. Die für REP 1-9 ermittelten DLA-Werte betrugen nur noch $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,3$ für Tumorzellen und $RLU_{FL}/RLU_{RL}=0,1$ für den gesunden Zelltyp, in dem daher kaum noch Transkription stattzufinden schien. Laut MatInspector-Analyse waren im Abschnitt REP 9 die Targetsequenzen für IRF 1 und IRF 2 lokalisiert (siehe Abb. 4.15). Da REP 8 keine potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren enthielt und sich der Abschnitt REP 1-8 aufgrund der GA-reichen Sequenz nicht amplifizieren ließ, wurde er im DLA gleich in den Abschnitt REP 1-9 miteinbezogen bzw. in der EMSA mit dem Abschnitt REP 9 zusammengefaßt. Für dieses Fragment, REP 8-9, konnten in beiden Zelltypen gleichermaßen zwei sequenzspezifische Protein-DNA-Bindungen nachgewiesen werden, die vermutlich von IRF 1 und IRF 2 herrühren. Die Sequenzspezifität konnte durch das Verschwinden der Bandshifts im spezifischen und das Wiedererscheinen der Banden im unspezifischen Kompetitionstest bewiesen werden (Abb. 4.24).

4.13 Cytogenetische Analysen

Mittels cytogenetischer Analysen galt es, die Lokalisation des LOXL4-Gens auf Chromosom 10 in malignen UT-SCC-19A-Zellen zu bestätigen und eventuell vorhandene Aberrationen dieses Chromosoms aufzuspüren, die für die Überexpression der LOXL4-mRNA verantwortlich sein könnten.

4.13.1 Klassische Chromosomenanalyse

Mittels klassischer Chromosomenanalyse wurden jeweils 10 komplette Karyogramme beider Zelltypen erstellt, um einen Überblick auf die in den Tumorzellen vorhandenen chromosomalen Aberrationen zu bekommen. Alle gesunden Epithelzellen wiesen einen normalen Karyotyp auf (siehe Abb. 4.24), d.h. in jeder Zelle waren 11 Autosomenpaare vorhanden, sowie ein X- und ein Y-Chromosom, was auf ein männliches Geschlecht hindeutete. Nach der gängigen Kurzform des International System of Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN; 1995) lässt sich dieser normale Karyotyp beschreiben als: 46,X,Y. „46“ bezeichnet die Anzahl der Autosomen, und „X,Y“ gibt die Geschlechtschromosomen an.

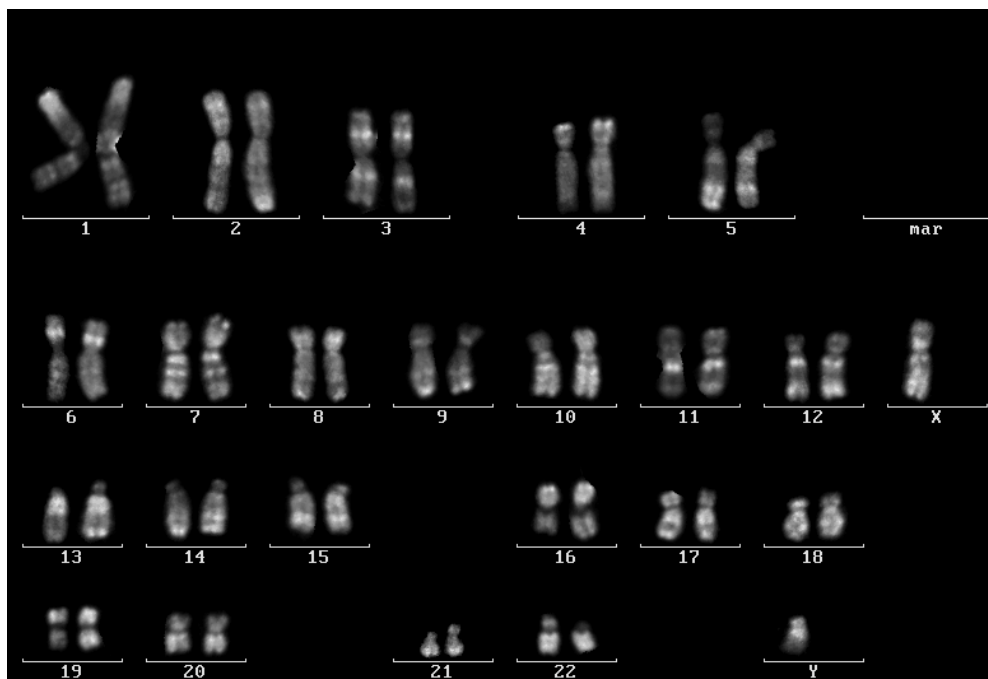


Abb. 4.25: Karyogramm einer gesunden Epithelzelle aus der Nasenschleimhaut. Einzelheiten siehe Text.

Im Gegensatz zu den gesunden Zellen wiesen die Tumorzellen zahlreiche chromosomale Aberrationen auf, die einem komplexen, hyperploiden Karyotyp (Abb. 4.25) folgender Kurzbezeichnung entsprachen:

$2n \sim 4n, X, del(X)(q25), add(1)(q12) \times 2, del(2)(p13 \sim 14), der(5;17)(p10;q10),$
 $add(5)(q10), add(7)(q11), add(9)(p21) \times 2, i(9)(q10), del(9)(q33), i(10)(q10), der(12)t(7;12)$
 $(q21;q24) \times 2, der(8;17)(q10;q10), add(19)(q13), der(21)t(1;21)(q11;p13), +2 \sim 5mar.$

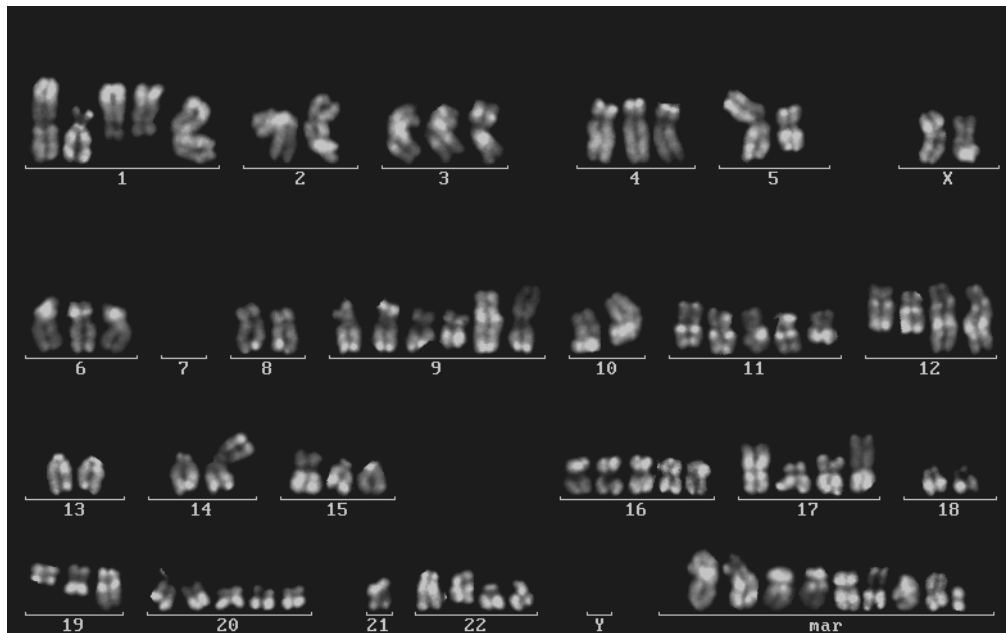


Abb. 4.26: Karyogramm einer Plattenepithelkarzinomzelle der Zelllinie UTSCC-19A. Der Chromosomensatz weist zahlreiche Aberrationen auf, die im Text beschrieben wurden.

Die Kurzbeschreibung „ $2n \sim 4n$ “ deutet darauf hin, dass jedes Autosom (n) im Durchschnitt in etwa 2-4facher Ausführung nachgewiesen werden konnte. Die weiteren Abkürzungen in der Kurzschreibweise sind folgendermaßen zu deuten:

del=Deletion: Verlust eines Chromosomenteilstücks,

add=Addition: Zugewinn eines Chromosomenteilstücks,

der=Derivat: Vorkommen von unbekanntem Chromosomenmaterial auf einem Chromosom,

i=Isochromosom: Deletion zweier Schwesterchromatiden und gleichzeitige Duplikation der beiden anderen Schwesterchromatiden,

t=Translokation: Verlagerung eines Chromosomenteilstücks,

mar=Markerchromosom=zusätzliches, nicht zuzuordnendes Chromosomen.

In der jeweils ersten Klammer hinter einer dieser Abkürzungen ist das betroffene Chromosom angegeben und in der zweiten Klammer der genaue Bereich auf diesem

Chromosom. „p“ und „q“ stehen dabei für die gleichnamigen Chromosomenarme und die zusätzlich angegebene Zahl für die Bande auf diesem Chromosomenarm. So bedeutet z. B. del(X)(q25), dass die Bande 25 auf dem q-Arm des X-Chromosoms deletiert ist.

Für die untersuchten UTSCC-19A-Zellen wurde eine hohe chromosomale Instabilität inklusive häufiger Bruchstellen in der Centromerregion vieler Chromosomen nachgewiesen, was dazu führte, dass nahezu jede Zelle einen anderen Chromosomensatz aufwies. Das in Abb. 4.26 dargestellte Karyogram ist daher nur exemplarisch für eine Tumorzelle.

Bezüglich des Chromosoms 10, auf dem das LOXL4-Gen lokalisiert ist, konnte in keiner Tumorzelle eine normale Kopie nachgewiesen werden. Stattdessen wurde eine besondere Form der chromosomalen Aberration, das Isochromosom i(10)(q10), detektiert, das aus 4 an der Centromer-Region fusionierten q-Armen des Chromosoms 10 besteht. Dieses Isochromosom trat in allen untersuchten Tumorzellen in einer ungefähr 2-8fachen Kopienzahl auf.

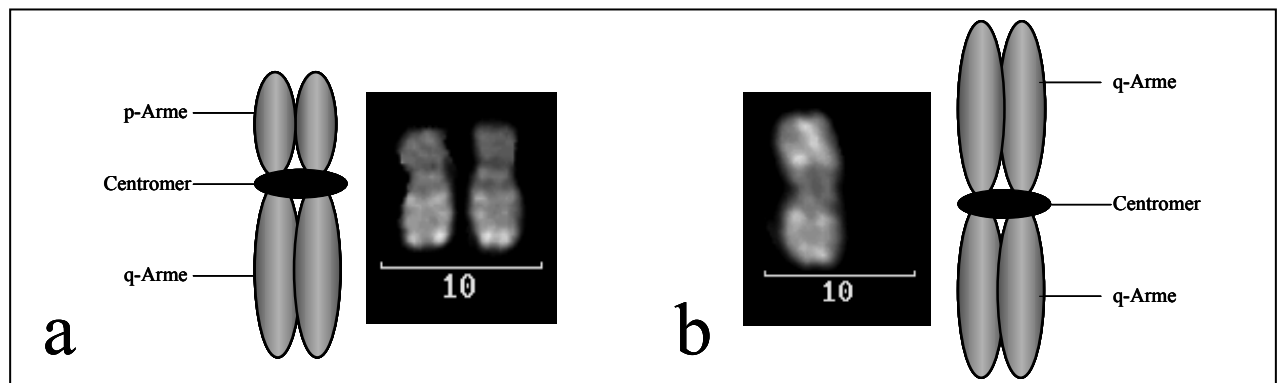


Abb. 4.27: Schematische Darstellung und Fotografie eines normalen (a) und eines Isochromosoms 10 (b) in der Metaphase.

4.13.2 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Nachdem mittels klassischer Chromosomenanalyse in allen untersuchten UT-SCC-19A-Zellen das Isochromosom 10 in einer variierenden Anzahl nachgewiesen worden war, galt es durch Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierungen die Auswirkungen dieser chromosomalen Aberration auf die Lokalisation und Amplifikation des LOXL4-Gens zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde die FISH-Technik nach entsprechender

Chromosomenpräparation sowohl an Interphase- als auch an Metaphase-Zellkernen der malignen UT-SCC-19A-Zellen durchgeführt.

Die Untersuchung von ca. 100 Interphase-Zellkernen diente dazu, einen Überblick auf die Kopienzahl sowohl des LOXL4-Gens als auch des Isochromosoms 10 zu erhalten, und zwischen diesen eine etwaige Korrelation nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde für die FISH eine das LOXL4-Gen überspannende Sonde (markiert mit Spectrum-green) und eine Sonde gegen die Centromerregion des Chromosoms 10 (markiert mit Spectrum-orange) eingesetzt. Abb. 4.28 zeigt eines der hergestellten Präparate bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop.

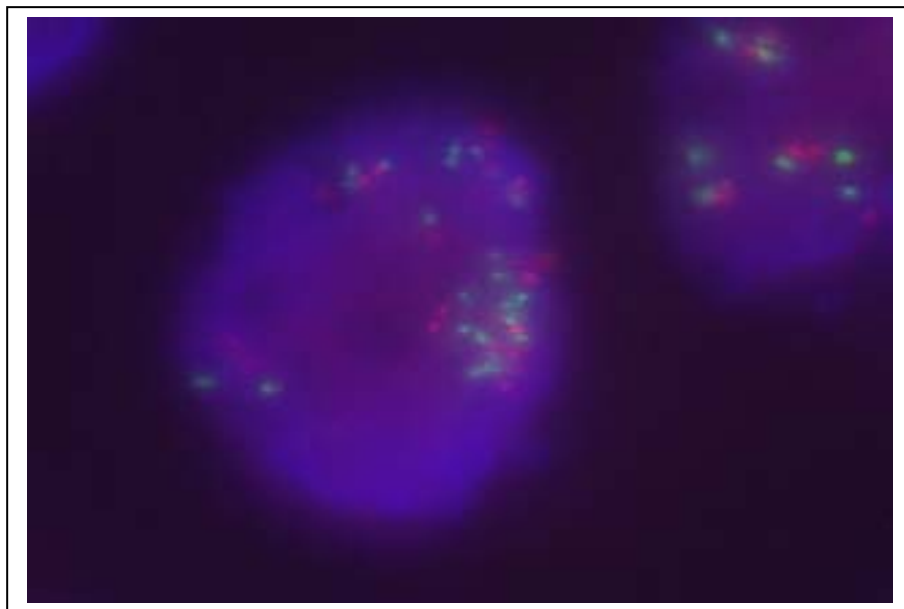


Abb.4.28: Nachweis des LOXL4-Gens auf Interphasechromosomen maligner UT-SCC-19A-Zellen durch FISH.

Zum Nachweis des LOXL4-Gens wurde eine das LOXL4-Gen überspannende Sonde verwendet, die mit dem Farbstoff Spectrum-green gekoppelt worden war. Entsprechend wurde mit einer Spectrum-orange markierten Sonde gegen die Centromerregion des Chromosoms 10 verfahren.

Da die Chromosomen in der Interphase dekondensiert vorliegen, waren sie nicht als solches erkennbar. Die Isochromosomen 10 waren daher lediglich indirekt durch die Hybridisierungssignale an ihren Centromeren zu identifizieren. Indem mehr als 2 Signale detektiert werden konnten wird deutlich, dass das Isochromosom 10 in den Karzinomzellen amplifiziert ist. Die Spectrum-green markierten Hybridisierungssignale, die die Lokalisation des LOXL4-Gens anzeigen, traten in etwa in der doppelten Häufigkeit gegenüber den Isochromosomen 10 in demselben Zellkern auf, d. h. das LOXL4-Gen ist ebenfalls amplifiziert. Da die LOXL4-Signale

stets in unmittelbarer Nähe zu den Signalen des Isochromosoms 10 auftraten, ist es wahrscheinlich, dass das ein oder mehrere LOXL4-Gene auf dem Isochromosom 10 lokalisiert sind. Insgesamt konnten in 17% der untersuchten Zellen mehr als 8 Kopien des LOXL4-Gens detektiert werden, in den übrigen 73% etwa 3-4 Kopien.

Um die Lokalisation des LOXL4-Gens auf dem Isochromosom 10 zu bestätigen, wurde die FISH an Metaphase-Chromosomen desselben Zelltyps angewandt. Da die Chromosomen in diesem Stadium des Zellzyklus kondensiert vorliegen, sind sie bei Betrachtung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 4.28) deutlich als solche zu erkennen und anhand ihrer Form und Länge der Chromosomenarme identifizierbar. Dadurch erübrigte sich bei dieser Untersuchung der Einsatz einer Sonde gegen die Centromerregion des Chromsoms 10. Stattdessen wurden zwei unterschiedlich markierte (Spectrum-green und Spectrum-orange) Sonden eingesetzt, die das LOXL4-Gen zu beiden Seiten flankierten. Mit Hilfe dieser Sonden sollte zum einen die Lokalisation des LOXL4-Gens auf Chromosom 10 bestätigt werden, gleichzeitig galten sie dem Nachweis etwaiger Bruchstellen infolge von Insertionen innerhalb des Gens. In Abb. 4.28 ist einer der 100 untersuchten Metaphase-Zellkerne exemplarisch dargestellt. In dem FISH-Präparat ist deutlich zu erkennen, dass sich auf einem Isochromosom 10 insgesamt 4 LOXL4-Gene befinden, d. h. doppelt so viele wie auf einem normalen Chromosom 10. Anhand der identischen Lokalisation beider Hybridisierungssignale der das LOXL4-Gen flankierenden Sonden wird deutlich, dass sich keine durch Insertionen hervorgerufenen Bruchstellen innerhalb des Gens befinden.

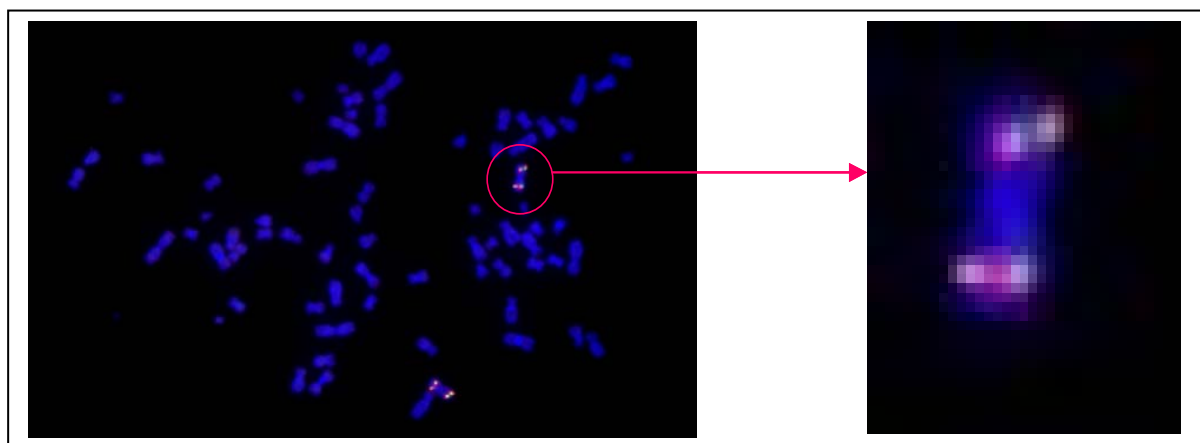


Abb. 4.29: Nachweis des LOXL4-Gens auf Metaphasechromsomen maligner UT-SCC-19A-Zellen durch FISH.

Die linke Abbildung zeigt die Chromosomen eines hyperploiden Metaphasezellkerns mit 2 Isochromosomen 10, von denen eines in der rechten Abbildung vergrößert dargestellt ist. Es sind deutlich die 4 Hybridisierungssignale für das LOXL4-Gen erkennbar.

Derartige Isochromosomen 10 wurden wie bereits bei der klassischen Chromosomenanalyse in jeder untersuchten UT-SCC-19A-Zelle in einer variierenden Anzahl nachgewiesen. Wie in Abb. 4.28 demonstriert, geht ihre Präsenz mit einer erhöhten Kopienzahl (Amplifikation) des LOXL4-Gens einher.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2000 bis September 2003 angefertigt, indem molekularbiologische Analysen zur Identifizierung, Charakterisierung und Regulation des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomzellen des oberen Aerodigestivtraktes durchgeführt wurden. Die Intention dieser Untersuchungen bestand darin, die Kenntnisse über das molekulargenetische Repertoire dieser Tumorentität zu erweitern.

5.1 Zelllinien als Ausgangsmaterial für Laborversuche

Um die Zielsetzungen im Rahmen dieser Doktorarbeit zu erfüllen, galt es diverse vergleichende molekularbiologische Analysen an Plattenepithelkarzinomzellen und an entsprechenden gesunden epithelialen Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes vorzunehmen. Um diese durchführen zu können, mussten hinreichend große Mengen unterschiedlicher Bestandteile der zu untersuchenden Zellen, wie z. B. RNA oder genomische DNA, gewonnen werden, weshalb die Notwendigkeit bestand, über eine entsprechend große Menge der zu untersuchenden Zellen als Ausgangsmaterial zu verfügen. Aus diesem Grund bot sich die Kultivierung von Zelllinien an. Durch ihre unkomplizierte Handhabung, ihr relativ schnelles Wachstum und die Möglichkeit der Subkultivierung konnte ein Reservoir an Zellmaterial geschaffen werden, auf das nach Bedarf zugegriffen werden konnte und das die unnötige Verschwendung rarer Gewebe-Biopsate vermeidbar machte. Als vorteilhaft bei der Verwendung der Zelllinien in den Analysemethoden erwies sich zudem ihre „Reinheit“, d. h. die Möglichkeit, sie selektiv kultivieren zu können. Dies war besonders für die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten DDRT-PCR in sofern von großer Bedeutung, als dass es in diesem Versuch das jeweils typische mRNA-Expressionsprofil maligner und gesunder Plattenepithelzellen zu vergleichen galt. Entsprechende Biopsate wären für diese Untersuchung ungeeignet gewesen, da sie ein Mischgewebe aus gesunden Schleimhautzellen, Fibroblasten und Zellen hämatopoetischen Ursprungs mit jeweils unterschiedlichem Expressionsmuster darstellen. Diese Gegebenheit hätte die

Detektion von ausschließlich tumorspezifischen differentiell exprimierten Genfragmenten erschwert.

Untersuchungen, die die Gültigkeit aller verwendeten Zelllinien als experimentelle Modelle für die entsprechenden Kopf-Hals-Malignome beweisen, sind eingehend von denjenigen Wissenschaftlern durchgeführt worden, die die Zelllinien etabliert haben. Ihre Namen sind in Tabelle 9.3.1 (siehe Anhang) den entsprechenden Zelllinien zugeordnet. So wiesen WORSHAM *et al.* (1991, 1993) in etablierten Plattenepithelkarzinomzelllinien unterschiedlicher Areale, entsprechenden frischen Zellen und primären Zellkulturen jeweils den gleichen Karyotyp nach. Sowohl CAREY *et al.* (1989) als auch BRADFORD *et al.* (1991) bestätigten dieses Resultat nach intensiven Untersuchungen an zahlreichen *in-vitro* Passagen derselben Zelllinien, wodurch auch genetische Veränderungen infolge von Langzeitkultivierung ausgeschlossen werden konnte.

Um den Modellcharakter der Plattenepithelkarzinomzelllinien noch einmal zu demonstrieren, wurden bestimmte Analysen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt worden waren, an ausgewählten Tumorbiopsaten wiederholt, so z.B. der Nachweis der Spezifität der Überexpression der LOXL4-mRNA mittels Northern Hybridisierung. In diesem Fall konnte in 53% der untersuchten Zelllinien sowie 54% der Biopsate eine Überexpression der LOXL4-mRNA nachgewiesen werden. Diese nahezu identischen Ergebnisse verifizierten die Eignung der Zelllinien als experimentelle Modelle, weshalb sich bei Durchführung weiterer Analysen an den gleichen Zelllinien eine stetige Wiederholung an Biopsaten erübrigte.

5.2 DDRT-PCR

Zur Detektion differentiell exprimierter Gene bieten sich neben der DDRT-PCR verschiedene molekularbiologische Methoden an, wie z. B. Gene-Arrays, Differentielle Hybridisierung oder Nuclear-Run-On, die sich in ihrem Funktionsprinzip stark voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zur DDRT-PCR basieren die genannten Verfahren auf dem Nachweis einer mRNA-Spezies durch Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde. Aufgrund dessen können mit ihnen nur solche Gene aufgespürt werden, deren Sequenzen bereits bekannt sind. Bislang unbekannte differentiell exprimierte Gene bleiben unentdeckt. Dem gegenüber stellt die DDRT-PCR eine innovative Analyse-methode dar, mit deren Hilfe jegliche

Veränderungen im gesamten mRNA-Expressionsmuster eines Zelltyps, z.B. nach maligner Transformation, sowohl qualitativ als auch quantitativ erfasst werden können. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, jedes in einer Zelle exprimierte mRNA-Molekül mit Hilfe eines empirisch ermittelten Sortiments an Zufallsprimern (12 Downstream- und 26 Upstream-Primer) revers zu transkribieren und anschließend mittels PCR zu amplifizieren. Mit den insgesamt 312 möglichen PCR-Ansätzen können ca. 38.000 Genfragmente generiert werden, wobei jedes in dem untersuchten Zelltyp exprimierte mRNA-Molekül von mindestens einem dieser Fragmente repräsentiert wird. Auf diese Weise ist nicht nur die Isolierung und Identifizierung bereits bekannter, sondern auch die unbekannter Gene möglich (BAUER *et al.*, 1993). Aus diesem Grund erschien die DDRT-PCR-Technik nach BAUER *et al.* (1993) die geeignetste Methode zu sein, um zu Beginn dieser Arbeit das mRNA-Expressionsprofil maligner und gesunder Plattenepithelzellen des Kopf-Hals-Bereichs vergleichend zu analysieren. Um die Reproduzierbarkeit der Amplifikationen zu überprüfen, wurden stets Doppelansätze hergestellt und zwecks Vergleich des Bandenmusters nebeneinander auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Da alle Doppelansätze ein paarweise identisches Muster zeigten, galt damit die Reproduzierbarkeit des Versuchs als bestätigt. Bei der DDRT-PCR-Analyse mit der Primerkombination D2/U12 wurde schließlich ein Genfragment aufgespürt, das eine auffällige Überexpression in den Tumorzellen gegenüber nahezu gar keiner Expression in gesunden Zellen zeigte. Wie im Ergebnis-Kapitel beschrieben, konnte das Fragment nicht unmittelbar nach der DDRT-PCR als Teilstück des LOXL4-Gens identifiziert werden, da dieses Gen zu dem gegebenen Zeitpunkt noch nicht bekannt war. Erst weiterführende Analysen mit Hilfe verschiedenster molekularbiologischer Techniken ermöglichten die Identifizierung des LOXL4-Gens.

Aus den gegebenen Umständen hätte die Anwendung von hybridisierungsgestützten Verfahren zum Nachweis differentiell exprimierter Gene nicht zur Detektion des LOXL4-Gens geführt, das nun erstmals durch Einsatz der DDRT-PCR in Assoziation mit Kopf-Hals-Karzinomen beschrieben werden konnte (HOLTMEIER *et al.*, 2003).

5.3 Nachweis der Spezifität der differentiellen Expression des gefundenen Genfragmentes mittels Northern Hybridisierung

Um die Spezifität der differentiellen Expression des in der DDRT-PCR gefundenen Genfragmentes zu demonstrieren, wurden Northern-Hybridisierungen mit Hilfe einer genspezifischen DIG-markierten cDNA-Sonde durchgeführt. Die dabei untersuchten RNA-Proben waren mit denen, die zuvor in der DDRT-PCR eingesetzt worden waren, identisch. Die Verwendung dieser Analyseverfahren war aus verschiedenen Gründen gegenüber einer alternativ verwendbaren Amplifikation durch PCR vorteilhaft. Während eine PCR-Analyse zuerst eine reverse Transkription aller mRNA-Moleküle voraussetzt, konnten die RNA-Proben bei der Northern-Hybridisierung direkt analysiert werden. Die Detektion des nachzuweisenden mRNA-Moleküls erfolgte dabei über Hybridisierung mit einer spezifischen, DIG-markierten cDNA-Sonde, die wiederum mit einem entsprechenden Antikörper detektiert wurde. Dies führte insgesamt zu einer solchen Verstärkung des Hybridisierungssignals, dass der Nachweis des zu detektierenden Moleküls nach dieser Methode erfahrungsgemäß wesentlich sensitiver war, als bei Visualisierung eines entsprechenden PCR-Produkts mit Ethidium-Bromid in einem Agarose-Gel. Ferner lieferte die Northern Hybridisierung diverse Zusatzinformationen, die mittels PCR nicht gewonnen werden konnten. So ermöglichte sie die Detektion des vollständigen, dem Genfragment zugehörigen mRNA-Moleküls, was dessen Größenbestimmung auf ca. 4kb erlaubte und damit zur Charakterisierung des bis dato unbekannten Gens entscheidend beitrug. Bei der PCR hätte dagegen nur ein Abschnitt aus der bis dato bereits bekannten Sequenz amplifiziert werden können und somit keine weiteren Kenntnisse über die Natur des Gens erbracht. Zusätzlich zum Nachweis des spezifischen mRNA-Moleküls ermöglichte die Northern-Hybridisierung, bei Applikation gleicher RNA-Mengen semiquantitative Unterschiede bezüglich des mRNA-Expressionslevels durch den Vergleich der Bandenintensität zu erfassen. Um die Verwendung einheitlicher RNA-Mengen zu kontrollieren und eventuelle Ungenauigkeiten bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung der RNA auszuschließen, wurde stets eine Rehybridisierung jedes RNA-Blots mit einer cDNA-Sonde zur Detektion der GAPDH-mRNA durchgeführt. GAPDH ist eines der wichtigsten Enzyme in der Glykolyse, die in nahezu allen Zellen in gleicher Weise stattfindet, unabhängig davon, ob diese einen aeroben oder anaeroben Stoffwechsel

vollziehen (KOOLMAN *et al.*, 1997). Das entsprechende Gen stellt somit ein House-Keeping-Gen dar, dessen Expressionslevel nahezu konstant ist und daher zur Kontrolle einheitlich eingesetzter RNA-Mengen geeignet ist.

Zwar besteht auch bei einer PCR-Analyse die Möglichkeit, das entsprechende Produkt gegenüber einem co-amplifizierten Standard, z.B. ebenfalls GAPDH oder β -Actin, mittels densitometrischer Analyseverfahren zu quantifizieren, jedoch ist diese Art der Quantifizierung recht ungenau. Wie zuvor beschrieben muß die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Effizienz dieser reversen Transkription ist jedoch nicht immer gleich, und so erfolgt über die anschließende PCR lediglich eine Quantifizierung der cDNA-Menge im Ansatz, aber nicht der tatsächlich vorhandenen mRNA-Menge im Ausgangsmaterial.

Die Northern Hybridisierung stellte in diesem Fall eine geeignete Methode dar, mit der ein gleichzeitig qualitativer und semiquantitativer Nachweis des vollständigen differentiell exprimierten mRNA-Moleküls gelang.

5.4 Analyse der LOXL4-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes

Mit Hilfe der Northern Hybridisierung wurde die mRNA-Expression des LOXL4-Gens, das nach RACE-PCR-Technik und Datenbankanalyse als solches identifiziert werden konnte, in einer statistisch repräsentativen Anzahl an Tumorzelllinien, malignen und benignen Tumorbiopsaten sowie gesunden epithelialen Schleimhautzellen des Kopf-Hals-Bereichs vergleichend untersucht (siehe 4.6). Anhand der erzielten Resultate konnte die Spezifität der differentiellen Expression dieses Gens erneut bestätigt werden. Ferner erlaubte die Anzahl der untersuchten Proben eine statistische Auswertung der Resultate durch Anwendung des Fisher-Exact-Tests. Hiernach zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen dem invasiven Potential der Tumore, gemessen an der Anzahl der Metastasen, und der LOXL4-mRNA-Expression (siehe 4.7). Aus Tabelle 9.3.1 ist evident, dass es auch Tumore gab, die Lymphknoten- und Fernmetastasen gebildet hatten, in denen aber keine LOXL4-mRNA-Überexpression nachgewiesen werden konnte, wie z. B. Nr. 34, 35 und 48. Diese Diskrepanz läßt sich auf unterschiedliche Gegebenheiten zurückführen. Zum

einen stellen Tumorbiopsate, wie bereits in 5.1 erwähnt, ein Mischgewebe aus Tumorzellen und gesunden Zellen, die mit den Resektionsrändern und dem konnektiven Gewebe anfallen, dar. Dies ist z.T. durch die großräumige Extirpation des Karzinoms begründet, die erforderlich ist, damit sich an den mikroskopischen Ausläufern des Tumors keine neuen Tumore bilden können. Da die Biopsate unmittelbar nach der Entnahme in Cryotubes überführt und in Flüssig-Stickstoff schockgefroren werden, wonach sie nicht wieder aufgetaut werden dürfen, ist äußerlich nicht mehr erkennbar, wo sich im Präparat der vorwiegend tumoröse Bereich befindet. Folglich werden bei der RNA-Isolierung durch Homogenisierung der gefrorenen Gewebeprobe stets auch gesunde epitheliale Schleimhautzellen aus den Randbereichen des Biopsats erfasst, die wie zuvor gezeigt, keine bzw. eine nur sehr schwache LOXL4-mRNA-Expression aufweisen.

Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen theoretisch vorhandener und praktisch nicht nachgewiesener LOXL4-Überexpression ergibt sich aus der genetischen Diversität der Kopf-Hals-Karzinome. Aufgrund der individuell unterschiedlichen Kumulation an diversen Mutationen, die zur Genese von Kopf-Hals-Karzinomen führen können, ist es nahezu unmöglich, einen universell nachweisbaren Tumormarker ausfindig zu machen. Jedoch können nach intensiver Erforschung des genetischen Repertoires von HNSCCs Korrelationen zwischen spezifischen genetischen Veränderungen und definierten Stadien der Karzinogenese nachgewiesen werden, so wie es das Modell von CALIFANO *et al.* (1996) demonstriert. Je mehr die Identifizierung und Charakterisierung genetischer Alterationen in Assoziation mit dieser Tumorentität fortschreitet, um so bessere Prognosen können durch ihre Hilfe gestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass das LOXL4-Gen in 53% aller untersuchten HNSCC-Zelllinien und 54% der HNSCC-Biopsate eine Überexpression aufweist, die darüber hinaus mit der Größe und dem invasiven Potential der Tumore korreliert.

5.5 Nuclear-Run-On

Die vergleichende Analyse der de-novo-Transkription des LOXL4-Gens in malignen und gesunden Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes mit Hilfe der Nuclear-Run-On-Methode stellt ein Experiment von großer Bedeutung innerhalb dieser Arbeit dar. Zunächst konnte mittels Northern Hybridisierung an einer statistisch repräsentativen Anzahl von Tumorproben zwar die Spezifität der differentiellen LOXL4-mRNA-Expression demonstriert werden, jedoch gab diese Methode keine Auskunft über die Ursache des alterierenden Expressionslevels im malignen gegenüber dem gesunden Zelltyp. In der eukaryontischen Zelle existieren u.a. zwei verschiedene prä-transkriptionale Kontrollmechanismen für die Genexpression, von denen beide in der Northern Hybridisierung zu dem gleichen Resultat geführt hätten. Bei dem Mechanismus der **Transkriptions-Kontrolle** wird der mRNA-Expressionslevel eines Gens durch Regulation dessen Transkriptionsrate beeinflusst. Der andere Mechanismus, die **mRNA-Abbau-Kontrolle**, bewirkt durch selektive Destabilisierung eines bestimmten mRNA-Moleküls eine Verminderung dessen Expressionslevels (ALBERTS *et al.*, 1995). Um der Frage nachzugehen, welche der beiden Kontrollen die differentielle LOXL4-mRNA-Expression reguliert, wurde die de-novo-Transkriptionsrate des Gens in beiden zu vergleichenden Zelltypen mit Hilfe des Nuclear-Run-On's untersucht. Bei Vorliegen einer Transkriptions-Kontrolle war zu erwarten, dass in den Karzinomzellen eine vergleichsweise hohe de-novo-Transkription gegenüber den gesunden Zellen nachgewiesen werden konnte. Im Falle der mRNA-Abbau-Kontrolle wäre eine de-novo-Transkriptionsrate gleicher Intensität zu erwarten gewesen. Nach Durchführung dieser Methode war auf dem autoradiographierten Röntgenfilm eine deutliche Bande als Resultat aktiver de-novo-Transkription des LOXL4-Gens in den Tumorzellen erkennbar. Für die gesunden Zellen konnte dagegen keine entsprechende Bande detektiert werden. Um einen Qualitätsunterschied der verwendeten Zellkerne ausschließen zu können, war die de-novo-Transkription des GAPDH-Gens co-analysiert worden, die sich auch für beide Zelltypen als identisch erwies. Somit entsprachen die gewonnen Resultate exakt den Erwartungen, die an eine differentielle Transkriptions-Kontrolle gestellt worden waren und die somit als bewiesen galt. Dieser Befund gab folglich Anlaß, sich in anschließenden

molekularbiologischen Untersuchungen eingehender mit der Ursache für die unterschiedliche Transkriptions-Kontrolle des LOXL4-Gens auseinander zu setzen.

5.6 Exon/Intron-Organisation

Bislang gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit der Struktur des LOXL4-Gens befassen. Bezüglich der Exon/Intron-Organisation ist zwar bekannt, dass das LOXL4-Gen 14 Exons enthält (ASUNCION *et al.*, 2001), jedoch gibt es bis dato keine Veröffentlichung, die die Organisation des Gens inklusive der Positionen der entsprechenden Exon- und Intronsequenzen demonstriert. Für die Durchführung weiterer vergleichender Analysen des LOXL4-Gens in malignen und gesunden Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes war die Kenntnis über die Gesamtsequenz jedoch von großer Wichtigkeit. Zum einen galt es die Sequenzen der LOXL4-Exons aus den beiden unterschiedlichen Zelltypen miteinander zu vergleichen, um auf etwaige Mutationen aufmerksam zu werden, die mit funktionellen Veränderungen des Proteins assoziiert sein könnten. Zum anderen sollte mittels FISH-Technik der Nachweis etwaiger intrachromosomaler Aberrationen erfolgen, die für die Überexpression des LOXL4-Gens verantwortlich sein könnten, wofür es spezifische DNA-Sonden gegen das LOXL4-Gen herzustellen galt. Um diese angestrebten Analysen zukünftig durchführen zu können, musste die Exon/Intron-Organisation zunächst ermittelt werden. Hierbei erwies sich die Information über die Lokalisation des Gens auf Chromosom 10q24 als äußerst hilfreich. Durch sie gelang es, mittels Datenbankanalyse die Klonsequenz AL139241 zu detektieren, die einen entsprechenden Abschnitt des Chromosoms 10 repräsentierte, und anhand derer nach Erstellen eines Alignments die potentielle Gesamtsequenz und die Exon/Intron-Organisation des LOXL4-Gens ermittelt werden konnte. Durch anschließende Amplifikation und Sequenzierung der putativen Exons und Introns wurde die Organisation verifiziert. Ohne die Information über die Lokalisation des Gens hätte ein erheblich aufwendigeres Verfahren zur Analyse der Exon/Intron-Organisation mittels Hybridisierung der LOXL4-mRNA mit genomischer DNA, anschließendem S1-Nuclease-Verdau und Sequenzierung der hybridisierten und nicht-hybridisierten Bereiche durchgeführt werden müssen.

Die Aufklärung der Organisation des LOXL4-Gens trug ferner zur Charakterisierung der Natur des Gens bei, indem sie eine Positionszuordnung der einzelnen Basen innerhalb des Gens ermöglichte. Erst nach erfolgter Zuordnung konnte ein 384bp langer Abschnitt des LOXL4-Gens zwischen der Transkriptions-Initiationststelle (Pos. +1) und dem Beginn von Exon 1 als 5'-untranslatierte Region (5'UTR) identifiziert werden. Werden diese 384bp zu der unter 4.5 (siehe Ergebnisse) ermittelten LOXL4-mRNA-Sequenz von 3531bp hinzu addiert, ergibt sich für die vollständige LOXL4-mRNA eine Gesamtlänge von 3915bp, was dem in der Northern Hybridisierung detektierten Signal von ca. 4kb entspricht. Dieser Befund schließt somit die Größendiskrepanz zwischen theoretisch ermittelter und praktisch nachgewiesener Länge des LOXL4-mRNA-Moleküls.

5.7 Vergleichende Analyse der 5'-flankierenden Region des LOXL4-Gens

Die 5'-flankierende Region eines Gens ist in entscheidender Weise an der Regulation der Genexpression beteiligt, da sie den Wirkungsort verschiedener Transkriptions-Kontrollmechanismen darstellt. Wichtige Komponenten der Transkriptions-Kontrolle sind zum einen kurze DNA-Abschnitte, die als Targetsequenzen für die spezifische Bindung von **Transkriptionsfaktoren** dienen, deren Diversität von Promotor zu Promotor unterschiedlich ist. Durch ihre Bindung an die DNA beeinflussen sie wiederum die Affinität bestimmter „basaler“ Transkriptionsfaktoren, die bei nahezu allen Promotoren an der TATA-Box binden und für die Initiation der Transkription verantwortlich sind. Aufgrund dieser Wechselwirkung können Transkriptionsfaktoren die Initiationsgeschwindigkeit regulieren. Die meisten Faktoren bewirken dabei eine Beschleunigung der Transkription, weshalb ihre Targetsequenzen als **Enhancer** bezeichnet werden. Transkriptionsfaktoren, die die Transkription hemmen, binden dagegen an **Silencer-Motive**. Während viele Transkriptionsfaktoren innerhalb der ersten hundert Basenpaare 5'-stromaufwärts vor der Transkriptions-Initiationsstelle binden, gibt es auch solche, die die Transkription aus einem Abstand von bis zu 50.000bp regulieren. Um aus dieser Entfernung mit den „basalen“ Transkriptionsfaktoren in

Wechselwirkung treten zu können, bildet die DNA Schleifen aus, wodurch beide Komponenten wieder in räumlicher Nähe zusammengebracht werden.

In Bezug auf das LOXL4-Gen konnte durch die vorangegangene Nuclear-Run-On-Analyse gezeigt werden, dass die Ursache für dessen differentielle Expression in malignen und gesunden Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes auf Ebene der Transkriptions-Kontrolle zu suchen war. Um der Frage nachzugehen, von welchen Promotorbereichen die Ursache der unterschiedlichen Transkriptionskontrolle herrührt, wurde die 5'-flankierende Region des LOXL4-Gens vergleichend in beiden Zelltypen analysiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Sequenz des potentiellen Promotorabschnitts ermittelt, was mit Hilfe der Datenbanksequenz AL 139241 als Vorlage durch einfache Amplifikationen mittels PCR gelang. Ohne die Datenbanksequenz hätte ein komplizierteres Amplifikationsverfahren durch Einsatz eines genspezifischen und eines Ankerprimers ähnlich der 5'-RACE-PCR-Technik angewendet werden müssen, um das gleiche Resultat zu erzielen. Nach der Sequenzierung wurde der 5'-flankierende Bereich des LOXL4-Gens beider Zelltypen miteinander verglichen, um etwaige Mutationen zu detektieren, die mit Veränderungen der Transkriptions-Kontrolle assoziiert sein könnten. Zu vermuten gewesen wären beispielsweise Punktmutationen, die entweder die Targetsequenz eines Transkriptionsfaktors unkenntlich gemacht oder neu erschaffen hätten. Bei dem Sequenzvergleich konnten jedoch keinerlei Mutationen nachgewiesen werden. Dennoch bestand weiterhin die Möglichkeit, Unterschiede in der Transkriptions-Kontrolle des LOXL4-Gens in beiden Zelltypen detektieren zu können, womit sich die nachfolgenden Untersuchungen befassten.

5.8 Entwicklung eines Modells für die Regulation des LOXL4-Gens

Indem diverse Targetsequenzen für die Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren im 5'-flankierenden Bereich des LOXL4-Gens mit Hilfe des Computerprogramms „MatInspector“ detektiert werden konnten (siehe 4.11.2), sollte ein Zusammenhang dieser Region mit der Regulation der Transkription untersucht werden. Wie zuvor beschrieben erfolgt diese Regulation hauptsächlich durch die Interaktion von allgemeinen mit basalen Transkriptionsfaktoren und durch Wechselwirkungen der

allgemeinen Transkriptionsfaktoren untereinander (ALBERTS *et al.*, 1995). Um den aktivierenden oder reprimierenden Einfluß verschiedener Abschnitte des LOXL4-Promotors auf das entsprechende Gen nachzuweisen, wurden Analysen mit Hilfe von Reportergenkonstrukten und anschließendem DLA durchgeführt. Da es sich hierbei um eine semiquantitative Methode handelte, war es möglich, die Abschnitte sowohl in gesunden als auch in malignen Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes vergleichend zu untersuchen (siehe 4.11.3 und 4.11.4). Zusätzlich zum DLA wurden die einzelnen LOXL4-Promotorfragmente einer EMSA-Analyse unterzogen, um auf differentiell bindende Transkriptionsfaktoren aufmerksam zu werden (siehe 4.12).

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden, DLA und EMSA, im Bezug zueinander diskutiert, und abschließend ein Modell für die Regulation des LOXL4-Gens in beiden Zelltypen erstellt.

5.8.1 Diskussion der DLA-Ergebnisse in Assoziation zu den EMSA-Ergebnissen

Die Analyse der Transkriptionsbeeinflussung durch die einzelnen LOXL4-Promotorabschnitte mittels DLA ist nur bedingt aussagekräftig. Durch diese Untersuchung kann zwar das etwaige Aktivierungspotential eines Promotorabschnitts auf die Genexpression ermittelt werden, jedoch ist dadurch weder bekannt, ob dieses Aktivierungspotential durch einen Transkriptionsfaktor hervorgerufen wird, noch wie sich dieser Abschnitt im Gefüge mit weiteren Promotorabschnitten verhält. Beides kann durch weitere molekularbiologische Analysen erforscht werden, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Über die Bindung von Transkriptionsfaktoren in einem bestimmten Promotorbereich gab die EMSA Aufschluß. Sie diente der ersten Einschätzung, an welchen potentiellen Targetsequenzen des LOXL4-Promotors Transkriptionsfaktoren binden und zeigte bei einer vergleichenden Analyse der unterschiedlichen Zelltypen, ob diese Bindung differentiell ist oder nicht. Wie sich das Transkriptionsaktivierungspotential eines LOXL4-Promotorabschnitts in Assoziation mit weiteren Promotorfragmenten verändert, wurde durch DLA-Analysen an den zusammenhängenden, vom Transkriptionsstart ausgehenden LOXL4-Promotorabschnitten ermittelt. Durch diese Untersuchung konnten z.B. Interaktionen

zwischen allgemeinen und basalen sowie zwischen allgemeinen Transkriptionsfaktoren untereinander berücksichtigt werden, die derart vermutlich auch *in vivo* stattfinden würden. Erst die gemeinsame Interpretation der Ergebnisse der genannten Analysen, die im folgenden Text vorgenommen wird und sich auf die unter 4.12 beschriebenen Ergebnisse bezieht, gab einen Einblick in die Regulation des LOXL4-Gens.

REP 1 und REP 1-2:

Weil das Transkriptionsaktivierungspotential für REP 1-2 dem des Fragmentes REP 1 entsprach, schien der Abschnitt REP 2 keinen Einfluß auf die Transkription des LOXL4-Gens zu haben. Da in REP 2 keine Targetsequenz für einen Transkriptionsfaktor lokalisiert war (siehe Tabelle 4.3), war auch keine Transkriptionsbeeinflussung durch diesen Abschnitt zu erwarten.

Die höhere Transkriptionseffizienz für REP 1-2 in malignen gegenüber gesunden Zellen ließ auf Unterschiede bezüglich der Transkriptionsinitiation durch die basalen Transkriptionsfaktoren schließen.

Die Initiation der Transkription ist von der sukzessiven Anbindung der Faktoren TFIID und TFIIB anhängig. Beide Proteine zusammen bilden den Komplex TBP (TATA-binding protein), welcher neben zahlreichen weiteren Faktoren einen Teil des Prä-Initiationskomplexes (PIC = pre-initiation complex) für die Transkription darstellt (PUGH, 1997). Erst nach erfolgreicher Bindung des TBP an die TATA-Box wird die RNA-Polymerase II an dieselbe Stelle rekrutiert, um die Transkription durchzuführen. Die Bindung des TBP an die DNA verläuft jedoch langsam, da das TBP in nicht-DNA-assoziiertem Zustand Homo-Dimere bildet, und die Dimerisierung mit der Bindung an die DNA konkurriert. Ist jedoch die Konzentrationen von TBP aus verschiedenen Gründen erhöht, verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der DNA-Bindung und die Transkription kann schneller initiiert werden (HOOPS *et al.*, 1992).

Basierend auf diesen Informationen wurde angenommen, daß die Transkription des LOXL4-Gens in den Tumorzellen schneller initiiert wird als im gesunden Zelltyp. Die in Abb. 4.17 demonstrierten EMSA-Ergebnisse für die Region REP 1-2 bestätigten diese Annahme, da der nachgewiesene sequenzspezifische Bandshift trotz Verwendung einheitlicher Proteinmengen eine stärkere Intensität für die Tumorzellen

aufwies. Die Spezifität der detektierten Protein-DNA-Bindung konnte anhand der abnehmenden Bandenintensität im spezifischen Kompetitionstest und der erneuten Bandenintensivierung im unspezifischen Kompetitionstest bewiesen werden. Die in Tumorzellen größere Bandenstärke ist laut obigen Informationen vermutlich auf die höhere Konzentration an TBP zurückzuführen, aufgrund derer die Transkription in Tumorzellen schneller initiiert werden kann.

REP 3 und REP 1-3:

Anhand der DLA-Ergebnisse für REP 3 und REP 1-3 wäre zu erwarten, daß ein Transkriptionsfaktor innerhalb der Region REP 3 an den LOXL4-Promotor anbindet, der normalerweise die Transkription aktiviert, aber in Assoziation mit dem weiter 3'-stromabwärts gelegenen Abschnitt REP 1-2 eine reprimierende Wirkung ausübt. Die Präsenz eines derartigen Transkriptionsfaktors konnte jedoch mittels EMSA nicht verifiziert werden. Aus diesem Grund kann die unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen REP 1-2 und REP 1-3 sowie zwischen den beiden Zelltypen untereinander in dieser Region nicht eindeutig erklärt werden. Möglicherweise nimmt hier eine unterschiedliche Faltung der DNA Einfluß auf die Transkription.

REP 4 und REP 1-4:

Nach den DLA-Werten zu urteilen, könnte die Bindung unterschiedlicher Transkriptionsaktivatoren im Abschnitt REP 4 für die Steigerung der Transkriptionseffizienz in beiden Zelltypen verantwortlich sein. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, da mittels EMSA keine sequenzspezifischen Protein-DNA-Bindungen in REP 4 nachgewiesen werden konnten. Somit bleibt wie bereits bei REP 3 die Veränderung in der Transkriptionsaktivierung gegenüber dem Abschnitt REP 1-3 sowie der Unterschied zwischen den DLA-Werten für beide Zelltypen ungeklärt. Auch hier kann nur vermutet werden, daß Unterschiede bezüglich der DNA-Faltung einen derartigen Einfluß auf die Transkription nehmen.

REP 5 und REP 1-5:

Anhand der DLA-Ergebnisse, die für REP 1-5 in malignen Zellen eine deutliche Steigerung der Transkriptionseffizienz gegenüber REP 1-4 zeigten, wurde die Präsenz eines Transkriptionsaktivators im Abschnitt REP 5 in Tumorzellen vermutet, was mit Hilfe der EMSA-Analyse bestätigt werden konnte. Wie bereits bei REP 1 konnte auch hier keine selektiv auf die Karzinomzellen beschränkte Protein-DNA-Bindung nachgewiesen werden, jedoch erneut eine wesentlich intensivere Bande als in den gesunden Zellen. Da mittels MatInspector-Analyse lediglich die Targetsequenz für den Transkriptionsfaktor RFX1 detektiert werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß die Transkriptionsaktivierung in Tumorzellen auf diesen Faktor zurückzuführen ist. Laut Literatur kann RFX1 in Abhängigkeit von Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren entweder als Transkriptions-Aktivator oder – Suppressor fungieren, wobei diese unterschiedlichen Funktionen von verschiedenen Domänen des Proteins ausgeführt werden (KATAN *et al.*, 1997). Demnach scheint RFX1 im LOXL4-Promotor eine transkriptionsaktivierende Funktion auszuüben, die in Tumorzellen aufgrund der dort erhöhten Konzentration dieses Proteins stärker ist als in gesunden Zellen.

REP 6 und REP 1-6:

Den DLA-Ergebnissen zufolge ging vom Fragment REP 6 ein Transkriptions-reprimierender Einfluß in beiden Zelltypen aus, der jedoch nach der EMSA-Analyse zu urteilen nicht auf einen Transkriptionsfaktor zurückzuführen war. Somit kann hier wiederum keine eindeutige Erklärung für die Transkriptionssenkung in REP 1-6 gegenüber REP 1-5 gegeben werden, sowie auch die Transkriptionsdifferenz zwischen beiden Zelltypen ungeklärt bleibt. Wie bereits für REP 3 und REP 4 kann auch hier nur angenommen werden, daß unterschiedliche Faltungen in der DNA zum vorliegenden Ergebnis geführt haben.

REP 7 und REP 1-7:

Aufgrund der DLA-Ergebnisse war in Fragment REP 7 die Präsenz eines Transkriptionsaktivators zu erwarten, der in Tumorzellen ein wesentlich höheres Aktivierungspotential zu haben schien. Mittels EMSA konnte die sequenzspezifische

Bindung eines Transkriptionsfaktors in REP 7 detektiert werden, die aber für beide Zelltypen identisch war. Da in diesem Fragment lediglich die Targetsequenz für CP1 lokalisiert war, ist anzunehmen, daß es sich bei dem nachgewiesenen Transkriptionsfaktor um CP1 handelt, der durch Interaktion mit einer Komponente des basalen Transkriptionsfaktors TFIID als Transkriptionsaktivator fungiert (COUSTRY *et al.*, 1998). TFIID stellt eine Untereinheit von TBP dar, das, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, in höherer Konzentration in den Tumorzellen gegenüber dem gesunden Zelltyp vorliegt. Möglicherweise wirkt sich dieser Konzentrationsunterschied derart auf die Interaktion mit CP1 aus, daß von diesem ein höheres Transkriptionsaktivierungspotential im malignen Zelltyp ausgeht.

REP 8, REP 9 und REP 1-9:

Die DLA-Daten lassen vermuten, daß von dem Fragment REP 9 eine Transkriptionsrepression ausgeht. Da sich laut MatInspector-Analyse keine Targetsequenz im Bereich REP 8 befand, wurden Abschnitt REP 8 und REP 9 zusammengefaßt in der EMSA untersucht. Dabei konnte die Bindung von zwei Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, bei denen es sich in Anlehnung an die MatInspector-Recherche um IRF 1 und IRF 2 handeln könnte. Laut Literatur haben beide Transkriptionsfaktoren die Fähigkeit, als Transkriptionsrepressor zu fungieren, was mit unseren Ergebnissen übereinstimmen würde (BIRNBAUM *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 2003). Der Nachweis beider Faktoren in der EMSA wies jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Zelltypen auf. Möglicherweise sind auch hier unterschiedliche Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Unterschiede in der räumliche Faltung der Promotor-DNA für dieses Phänomen verantwortlich. An den DLA-Ergebnissen für REP 1-9 ist erkennbar, daß die Transkription von LOXL4 im gesunden Zelltyp nahezu zum Erliegen kommt, wogegen die Transkription in Tumorzellen aktiver erfolgt.

Fazit: Die hier erläuterten DLA- und EMSA-Ergebnisse beruhen zwar in vielen Fällen auf Mutmaßungen, die jedoch in Verbindung mit Informationen aus der Literatur in einen sinnvollen Zusammenhang gebracht werden konnten. Um die genaue Regulation eines Gens aufzuklären, bedarf es Jahre intensiver Forschung,

um a) die wirksamen Transkriptionsfaktoren eindeutig zu identifizieren (z.B. mittels DNaseI-Footprint), b) das genaue Transkriptions-Aktivierungspotential dieser Faktoren zu ermitteln (z.B. durch Inhibitionsversuche), c) die Interaktionen der Transkriptionsfaktoren zu analysieren, d) übergeordnete Signalwege aufzuklären, e) Unterschiede bezüglich der Faltung der Promotor-DNA zu identifizieren und f) chemische Modifikationen der Promotor-DNA wie z.B. Methylierungen nachzuweisen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern lediglich ein hypothetisches Grundmodell für die Regulation des LOXL4-Gens in gesunden und malignen Plattenepithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes (Abb. 4.29), das zahlreiche Anhaltspunkte für die detailliertere Analyse liefert. Es zeigt, daß das LOXL4-Gen in gesunden und malignen Zellen von den gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen besteht dahingehend, als daß die Transkriptionsfaktoren TBP und RFX1 in den Tumorzellen in höherer Konzentration als in gesunden Zellen vorliegen oder aber, was alternativ denkbar wäre, stabiler an die Promotor-DNA-des LOXL4-Gens binden. Da sowohl TBP als auch RFX1 eine Transkriptionsaktivierung bewirken, ist in diesem Phänomen ein potentieller Grund für die Überexpression des LOXL4-Gens in HNSCC-Zellen zu sehen.

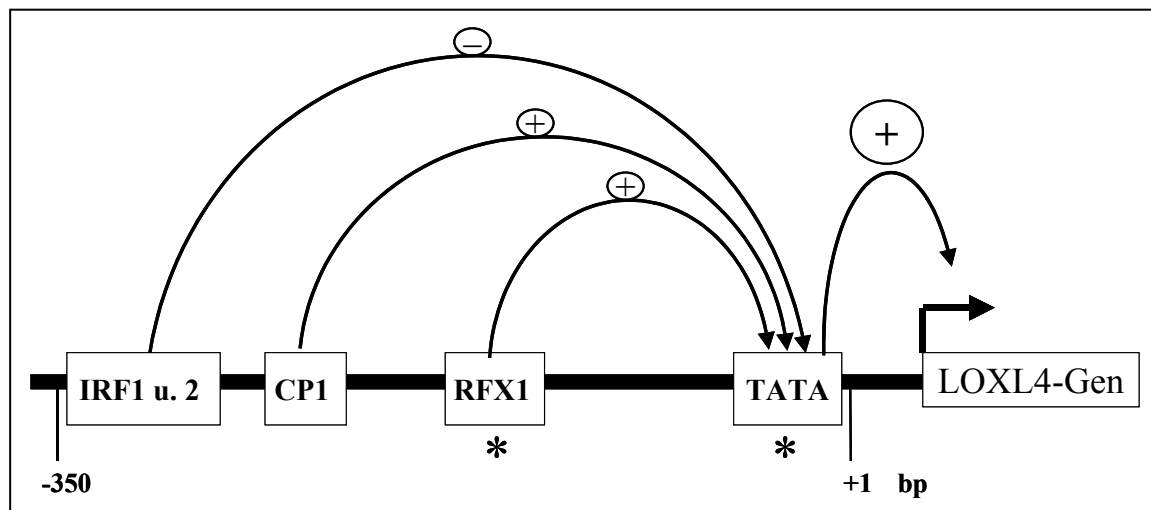


Abb. 5.1: Hypothetisches Modell für die Wirkung verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die Transkription des LOXL4-Gens.

Der schwarze Balken symbolisiert die Promotor-DNA mit den daran gebundenen allgemeinen Transkriptionsfaktoren, deren unterschiedliche Wirkung (+ aktivierend; - reprimierend) auf die basalen Transkriptionsfaktoren an der TATA-Box durch die Pfeile dargestellt wird. Der von der TATA-Box auf das LOXL4-Gen ausgerichtete Pfeil zeigt die „Netto“-Transkriptionsaktivierung an, so daß folglich das LOXL4-Gen transkribiert wird. Der eckige Pfeil symbolisiert die Transkriptionsrichtung. Das Stern-Symbol kennzeichnet diejenigen Transkriptionsfaktoren, für die in der EMSA-Analyse eine höhere Konzentration oder stabilere DNA-Bindung in Tumorzellen nachgewiesen wurde. Weitere Erläuterungen sind dem obigen Text zu entnehmen.

5.9 Cytogenetische Analysen

Auf Ebene der Transkriptions-Regulation konnten bereits potentielle Ursachen für die Überexpression des LOXL4-Gens in HNSCC-Zellen nachgewiesen werden. Aber auch chromosomale Aberrationen, wie z.B. Polysomien oder Translokationen, können die Regulation eines Gens beeinflussen. Die cytogenetische Analyse der UT-SCC-19A-Zellen erschien insofern sinnvoll, als daß Polysomien und chromosomale Instabilität mit der Malignität epithelialer Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes korrelieren (HITTELMAN, 2001).

Wie im Ergebnis-Teil beschrieben, wurden mit Hilfe der klassischen Chromosomenanalyse zahlreiche Chromosomenveränderungen u.a. in Form von Deletionen, Translokationen und Polysomien nachgewiesen. Besonderes Interesse weckte jedoch nur die Detektion des Isochromosoms 10, das in allen untersuchten Karzinomzellen in variierender Anzahl auftrat. Diese Aberration erschien insofern von Bedeutung, als dass das LOXL4-Gen auf Chromosom 10q24 lokalisiert ist (MÄKI *et al.*, 2001). Durch die anschließend durchgeführte FISH-Analyse an Interphase- und Metaphasechromosomen der UT-SCC-19A-Zellen konnte eine Korrelation zwischen der Präsenz des Isochromosoms 10 und der Amplifikation des LOXL4-Gens hergestellt werden. Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu einem normalen Metaphase-Chromosom 10 mit nur 2 LOXL4-Genen im Isochromosom 10 insgesamt 4 LOXL4-Gene lokalisiert sind. Zusätzlich variierte die Anzahl der Isochromosomen 10, so daß in ca. 17% der untersuchten Interphase-Zellen mehr als 8 Kopien, in den übrigen 73% ca. 4 Kopien des LOXL4-Gens nachgewiesen werden konnten. Es ist daher davon auszugehen, daß die hier detektierte Amplifikation des LOXL4-Gens in Tumorzellen um mehr als die doppelte Kopienzahl als in gesunden Zellen die ohnehin erhöhte Expressionsrate des Gens in diesem Zelltyp noch zusätzlich steigert.

5.10 Die Rolle der Lysyl-Oxidasen (LOs) bei der Karzinogenese

Die Enzyme der Lysyl-Oxidase-Familie sind vielfach im Zusammenhang mit karzinomatösen Erkrankungen untersucht worden. Die meisten veröffentlichten Resultate beziehen sich jedoch nur auf LOX, die zuerst entdeckte Isoform, deren Funktion bei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich zu sein scheint. So wiesen HE *et al.* (2002) eine verminderte LOX-mRNA-Expression in Plattenepithelkarzinomen des oberen Digestivtraktes im Vergleich zu dem gesunden Zelltyp nach und stellten eine Korrelation zwischen LOX-mRNA-Repression und infiltrierten Lymphknoten fest. Ebenso wurde ein Rückgang der LOX-mRNA-Expression an Colon-Karzinomen (CSISZAR *et al.*, 2002) sowie an tumorösen Nierenfibroblasten der Ratte detektiert (GIAMPUZZI *et al.*, 2001).

Derartige Beobachtungen erscheinen in Assoziation mit der ursprünglichen Funktion von LOX als Stabilisator der extrazellulären Matrix (EM) sinnvoll. In den beschriebenen Fällen wurde suggeriert, dass die Lysyl-Oxidase infolge einer Mutation ihre Funktion verliert und daher nicht mehr zur Stabilisierung der EM Beitragen kann, was wiederum die Tumorprogression begünstigt, da die malignen Zellen leichter in das umgebene Gewebe invasieren können.

Weitere Publikationen beschreiben jedoch nicht nur den Verlust der genannten Ursprungsfunktion von LOX bei der Tumorgenese, sondern sprechen darüber hinaus dem LOX-Gen eine Funktion als Tumorsuppressorgen zu, das als Antagonist zum ras-Onkogen fungiert. So konnten CONTENTE *et al.* (1999) eine verringerte LOX-mRNA-Expression in Zellen nachweisen, die zuvor mit ras transformiert worden waren. Sie begründeten dies mit dem Auftreten zusätzlicher Methylierungen im Promotorbereich des LOX-Gens in Folge der Transformation, was zu einer Hemmung der Transkription führte.

Im Gegensatz zu den eben genannten Veröffentlichungen beobachteten KIRSCHMANN *et al.* (2002) eine erhöhte Expression sowohl der LOX- als auch der LOXL2-mRNA in invasiven und metastasierenden Brustkrebszellen im Gegensatz zum weniger invasiven und gesunden Zelltyp. Entsprechende Befunde wurden von AKIRI *et al.* (2003) über die erhöhte Expression von LOXL in metastasierenden Brustkrebs-Zelllinien publiziert. Basierend auf diesen Ergebnissen wird LOX und

seinen Isoformen LOXL und LOXL2 eine bislang ungeklärte Rolle bei der Tumorinvasion zugesprochen.

5.11 Die Rolle des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes

In dieser Arbeit wurde mittels DDRT-PCR, Northern Hybridisierungen und Nuclear-Run-Analyse eine Überexpression der LOXL4-mRNA in Plattenepithelkarzinomzellen gegenüber dem gesunden Zelltyp nachgewiesen. Basierend auf der statistischen Auswertung der durch Northern-Hybridisierung gewonnenen Resultate tritt diese Überexpression in 53% der untersuchten HNSCC-Zelllinien und in 54% der HNSCC-Biopsate auf und zeigt zudem eine positive Korrelation gegenüber der Invasivität der Tumore sowie deren Größe. Diese Ergebnisse ähneln den Beobachtungen, die bereits an der LOX-, LOXL- und LOXL2-mRNA-Expression in Assoziation mit invasiven Brustkrebszellen gemacht wurden (KIRSCHMANN *et al.*, 2002; AIKIRI *et al.*, 2003). Aus diesem Grund bestätigen die in dieser Arbeit erzielten Resultate die potentielle Rolle der genannten Lysyl-Oxidasen bei der Karzinogenese.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie auch die Beobachtungen von KIRSCHMANN *et al.* (2002) und AIKIRI *et al.* (2003) erscheinen gegenüber den Erkenntnissen von HE *et al.* (2002), GIAMPUZZI *et al.* (2001) und CSISZAR *et al.* (2002) paradox, wenn man lediglich die ursprüngliche Funktion der Lysyl-Oxidasen als Stabilisatoren der extrazellulären Matrix in Betracht zieht. Seit einiger Zeit schreibt man der Familie der Lysyl-Oxidasen jedoch viele weitere Funktionen im extrazellulären, intrazellulären und sogar intranucleären Bereich zu (WAKASAKI und OOSCHIMA, 1997; LI *et al.*, 1997). Dazu zählen z.B. Funktionen bei der Regulation von Entwicklungsprozessen (CECIL *et al.*, 1997), bei der Zelladhäsion und Seneszenz (SAITO *et al.*, 1997) und bei der Zellwachstumskontrolle (CSISZAR, 2001). Die genauen Aufgaben der Lysyl-Oxidasen konnten jedoch in den meisten dieser genannten Funktionsbereiche bislang nicht genauer spezifiziert werden. Auch die Funktionsbereiche wurden lediglich von den genannten Wissenschaftlern postuliert und basieren auf dem Nachweis sinnvoller Korrelationen bestimmter Gegebenheiten, genau wie die in dieser Arbeit erörterte Überexpression der LOXL4-mRNA in HNSCCs. Dies bedeutet demnach, dass die

genauen Funktionen der Lysyl-Oxidasen, insbesondere der jüngsten und daher am wenigsten erforschten Isoform LOXL4 bis dato nicht vollständig bekannt sind, und so kann basierend auf den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nur erneut über die Funktion des LOXL4-Gens in Assoziation mit HNSCCs spekuliert werden. Hierzu bieten sich zwei Denkansätze an:

Zum einen wäre denkbar, dass auch die Isoform LOXL4 die ursprüngliche Funktion der Lysyl-Oxidasen als Stabilisator der EM ausübt und damit als Antagonist gegenüber Matrix-destabilisierenden Enzymen, wie z.B. einer Metalloproteinase, fungiert. Wird bei der Karzinogenese die Metalloproteinase verstärkt exprimiert und überschreitet einen bestimmten Schwellenwert, könnte dies zur Aktivierung eines „Schutzprogramms“ in der Zelle führen, infolge dessen LOXL4 ebenfalls vermehrt amplifiziert wird, um durch eine zusätzliche Verstärkung der EM eine Invasionsbarriere für die entartete Zelle herzustellen. Basierend auf dieser Annahme würde dies die unterschiedlichen Expressionsraten in den verschiedenen untersuchten Zelltypen erklären: Keine bzw. eine sehr geringe Expression in gesunden Zellen, da hier keine zusätzliche Stabilisierung der EM neben der durch andere LOX-Isoformen erforderlich ist; leicht erhöhte Amplifikation in 26% der benignen Tumoren, um die maligne Entartung zu unterbinden; hohe Amplifikation in 54% der Karzinome, um das Ausmaß der Invasion zu beschränken.

Als zweites kann über eine Funktion des LOXL4-Gens als Onkogen bei HNSCCs spekuliert werden, dessen Überexpression mit der Tumorinvasivität und Tumorgroße korreliert. Dafür spräche, dass ähnliche Korrelationen bei anderen Onkogenen z. B. beim PRAD-1-Gen beobachtet werden konnten. In diesem Falle wäre es wahrscheinlich, dass das LOXL4-Enzym keine Rolle bei der Stabilisierung der EM spielt, sondern eher eine Funktion bei der Zellwachstumskontrolle innehaben könnte. Der Besitz des Signalpeptids widerspräche einer derartigen intrazellulären Funktion nicht, da KAGAN *et al.* (1995) bereits nachweisen konnten, dass dem Signalpeptiden der Lysyl-Oxidasen keine essentielle Funktion bei der Faltung, dem Prozessing und der Ausschleusung aus der Zelle zukommt. Ferner wurden auch andere Isoformen der Lysyl-Oxidase bereits intrazellulär und intranucleär nachgewiesen (WAKASAKI und OOSCHIMA, 1997; LI *et al.*, 1997).

An dieser Stelle können lediglich Hypothesen über die Funktion von LOXL4 aufgestellt werden. Diese aufzuklären war auch nicht Ziel dieser Doktorarbeit. Es galt

hier lediglich, zur molekularen Charakterisierung von Plattenepithelkarzinomen beizutragen, indem möglichst viele Informationen über ein bislang relativ unbekanntes Gen gesammelt wurden, dessen mRNA-Überexpression mit HNSCCs assoziiert ist. Die Charakterisierung dieser Tumorentität ist von großer Bedeutung, da sie aufgrund ihrer geringen Prävalenz bislang nicht sehr intensiv erforscht wurde, aber aufgrund ihrer Aggressivität eine hohe Sterberate aufweist. Erst durch genaue Charakterisierung der molekulargenetischen Vorgänge, kann die Genese dieser karzinomatösen Erkrankung verstanden und die Erkenntnisse zur Entwicklung entsprechender Gentherapien, Krebstherapeutika, zu einer besseren Früherkennung und besseren Behandlungsstrategie genutzt werden.

Es bleibt zu erforschen, welche Funktion dem LOXL4-Enzym in Assoziation mit der Genese von HNSCCs zukommt und inwieweit anhand des mRNA- oder Protein-Expressionslevels eine Prognose über den Verlauf der Erkrankung getroffen werden kann. Aus diesem Grund ist die Herstellung von rekombinantem LOXL4 zur Gewinnung monoklonaler Antikörper in Mäusen Gegenstand derzeit durchgeführter Untersuchungen. Erste Versuche der Proteinherstellung in einem bakteriellen Expressionssystem scheiterten, weshalb in Zukunft Insekten- oder Säugerzellen für dieses Vorhaben verwendet werden. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern soll zukünftig der immunhistochemische Nachweis des LOXL4-Enzyms ermöglicht werden, was zu dessen weiteren Charakterisierung beiträgt.

6 Zusammenfassung:

Identifizierung, Charakterisierung und Regulation des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomzellen und –Biopsaten des oberen Aerodigestivtraktes

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Intention angefertigt, das molekulargenetische Repertoire von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes zu erweitern. Bei einem Vergleich des mRNA-Expressionsmuster zwischen malignen und gesunden Plattenepithelzellen konnte ein 59bp langes Genfragment detektiert werden, das eine starke Überexpression in den Tumorzellen gegenüber einer sehr schwachen Expression im gesunden Zelltyp aufwies. Das Fragment wurde als Teilstück des LOXL4-mRNA-Moleküls (ca. 4kb) identifiziert, das damit erstmals in Assoziation mit HNSCCs beschrieben werden konnte (HOLTMEIER et al., 2003). Durch Northern-Blot-Analysen an einer statistisch repräsentativen Anzahl von RNA-Proben konnte in 8/15 (53%) untersuchten HNSCC-Zelllinien, in 30/55 (54%) HNSCC-Biopsaten, sowie in 8/30 (26%) benignen Tumoren, jedoch in 0/13 Proben gesunder Zellen eine Überexpression der LOXL4-mRNA nachgewiesen werden. Die Überexpression erwies sich damit als spezifisch für Tumorproben und zeigte ferner nach statistischer Auswertung eine positive Korrelation gegenüber dem invasiven Potential so wie der Größe der Tumore. Eine anschließende Nuclear-Run-On-Analyse demonstrierte, dass die differentielle Überexpression im malignen und gesunden Zelltyp auf eine unterschiedliche Transkriptionsrate des Gens und nicht auf einen differentiellen Abbau des mRNA-Moleküls zurückzuführen war. Nach Ermittlung der Exon/Intron-Organisation und der Promotorsequenz des LOXL4-Gens zeigte ein Vergleich der entsprechenden Sequenzen beider Zelltypen keine Unterschiede, die sich verändernd auf das Protein auswirken könnten. Vergleichende Untersuchungen von Promotorabschnitten des Gens mit Hilfe von Reportergenkonstrukten und EMSA-Analysen demonstrierten, dass die Regulation des LOXL4-Gens in den beiden Zelltypen prinzipiell gleich ist. Jedoch zeigte die EMSA-Untersuchung, dass zwei an der Regulation beteiligte Transkriptionsfaktoren, TBP und RFX1, in den Karzinomzellen entweder eine höhere Konzentration oder eine stabilere Bindung an die DNA aufweisen. Dies führt vermutlich zu der erhöhten

Transkriptionsrate des LOXL4-Gens in dem malignen Zelltyp, die mittels Dual-Luciferase-Assay bestätigt werden konnte.

Untersuchungen an HNSCC-Zellen mit Hilfe der FISH-Technik bestätigten die Lokalisation des LOXL4-Gens auf Chromosom 10 und ermöglichten den Nachweis einer Aberration dieses Chromosoms (Isochromosom 10), die mit einer Amplifikation des LOXL4-Gens korreliert. Insgesamt zeigten 17% der mittels FISH untersuchten HNSCC-Zellen in der Interphase mehr als 8 Kopien des LOXL4-Gens. Es ist anzunehmen, dass die Amplifikation des LOXL4-Gens in Karzinomzellen die ohnehin erhöhte Transkriptionsrate des gleichen Gens in diesem Zelltyp zusätzlich steigert und beide Phänomene zur Überexpression des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomzellen des oberen Aerodigestivtraktes beitragen.

7 Summary

Identification, characterization and regulation of the LOXL4-gene in squamous cell carcinoma cells and biopsies of the upper aerodigestive tract

The present thesis was carried out with the intention to extend the molecular genetical repertory of squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract (=HNSCCs). Comparing the mRNA-expression pattern of malignant and healthy squamous cells, a 59bp gene-fragment could be detected, which showed a strong overexpression in tumor cells contrary to a very weak expression in the healthy cell type. The fragment was identified as a part of the LOXL4-mRNA molecule (about 4kb) and could be described in association with HNSCCs for the first time (HOLTMEIER *et al.*, 2003). After Northern-Blot-analysis by the use of a statistically representative number of RNA-samples, 8/15 (53%) HNSCC cell lines, 30/55 (54%) HNSCC-biopsies, 8/30 (26%) benign tumors, but 0/13 cultures of healthy cells revealed an overexpression of the LOXL4-mRNA. Hence, the overexpression was proven to be specific for tumor samples, and further a positive correlation with the invasive potential as well as with the size of the tumors could be shown after a statistical evaluation. Subsequently Nuclear-Run-On-analysis demonstrated the differential overexpression in the malignant and the healthy cell type to be based on a different transcription rate and not on a differential reduction of the mRNA molecule. After investigation of the exon/intron-organization and the promoter sequence belonging to the LOXL4-gene, a comparison of the corresponding sequences of both cell types revealed no alterations that could have consequences for the protein. Comparative studies of promoter fragments using reporter gene constructs and EMSA-analysis demonstrated, that generally the regulation of the LOXL4-gene is equal in both cell types. Nevertheless, according to the EMSA-results two transcription factors involved in the regulation of the LOXL4-gene, TBP and RFX1, exhibited a higher concentration or a tighter DNA-binding in the carcinoma cells. This might lead to the increased transcription rate in this cell type, that could be confirmed by Dual-Luciferase-Assay. Studies on HNSCC-cells using the FISH-technique verified the localization of the LOXL4-gene on chromosome 10 and made

it possible to demonstrate an aberration of this chromosome (isochromosome 10), which is correlated with an amplification of the LOXL4-gene. Altogether 17% of the HNSCC-cells examined by FISH in the interphase revealed more than 8 copies of the LOXL4-gene. We assume, that the amplification of the LOXL4-gene in the carcinoma cells additionally enhances the increased transcription rate of the same gene in this cell type and that both of these phenomena contribute to the overexpression of the LOXL4-gene in squamous cell carcinoma cells of the upper aerodigestive tract.

8 Literaturverzeichnis

1. Aird WC, Parvin JD, Sharp PA *et al.* (1994): The interaction of GATA-1 binding proteins and basal transcription factors with GATA box-containing core promoters. A model of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **269**: 883-9
2. Akervall JA (1998): Prognostic factors in Squamous cell carcinoma of the head and neck with emphasis on 11q13 rearrangements and cyclin D1 overexpression. Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery University Hospital of Lund, Sweden
3. Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H (1997): Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the progression value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* **79**: 380-389
4. Akiri G, Sabo E, Dafni H *et al.* (2003): Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res* **63**: 1657-66
5. Alberts B, Bray D, Lewis J *et al.* (1995): Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage; VCH, Weinheim
6. Asuncion L, Fogelgren B, Fong KSK *et al.* (2001): A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cystein rich domain. *Matrix Biology* **20**: 487-91
7. Batsakis J (1974): Tumors of the head and neck. Clinical and pathological consideration. Waverly Press, Inc.; Baltimore, USA
8. Bauer D, Müller H, Reich J *et al.* (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acid Res* **21**: 4272-4280
9. Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23
10. Bishop JM (1986): Krebsgene. In: Krebs – Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaften: Verständliche Forschung
11. Bleich S, Kropp S, van Stripriaan H (1995): Kurzlehrbuch Allgemeine Pathologie; Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York
12. Blin N, Stafford DW (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* **3**: 2303-8
13. Blobel GA, Sieff CA, Orkin SH (1995): Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* **15**: 3147-53

14. Bradford CR, Kimmel KA, Van Dyke DL *et al.* (1991): 11p deletions and breakpoints in squamous cell carcinoma: Association with altered reactivity with the UM-E7 antibody. *Genes Chromosomes Cancer* **3**: 272-282
15. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
16. Bron L, Monnier P (1995): Molecular alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Otolaryngology* **20**: 291-298
17. Cairns J (1986): Das Krebsproblem. In: Krebs – Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaften: Verständliche Forschung
18. Califano J, van der Riet P, Westra W *et al.* (1996): Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* **56**: 2488-2492
19. Carey TE (1994): Head and Neck Tumor Cell Lines. In: Atlas of Human Tumor Cell Lines. Hay RJ, Park J-G, Gazdar A (eds.); Academic Press
20. Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ *et al.* (1989): Characterization of human laryngeal primary and metastatic squamous cell carcinoma cell lines UM-SCC-17A and UM-SCC 17B. *Cancer Res* **49**: 6098-6107
21. Casey ML, MacDonald PC (1997): Lysyl oxidase (ras recision gene) expression in human amnion: ontogeny and cellular localization. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 167-72
22. Contente S, Kenyon K, Sriraman P *et al.* (1999): Epigenetic inhibition of lysyl oxidase transcription after transformation by ras oncogene. *Mol Cell Biochem* **194**: 79-91
23. Coustry F, Sinha S, Maity SN *et al.* (1998): The two activation domains of the CCAAT-binding factor interact with the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex. *Biochem J* **331**: 291-7
24. Csiszar K (2001): Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **70**: 1-32
25. Csiszar K, Fong SF, Ujfalusi A *et al.* (2002): Somatic mutations of the lysyl oxidase gene on chromosome 5q23.2 in colorectal tumors. *Int J Cancer* **97**: 636-42
26. Davidson BJ, Schantz SP: Biology of the Upper Aerodigestive Tract carcinoma. In: Advances in Head and Neck Oncology; Robbins KT (edt); Singular Publishing Group, London, San Diego
27. Elomaa L, Joensuu H, Kulmala J *et al.* (1995) : Squamous cell carcinoma is highly sensitive to taxol, a possible new radiation sensitizer. *Acta Otolaryngol* **115**:340-344

28. Field JK, Spandidos DA, Stell PM (1989): Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **4**: 1463-1468
29. Fogh J, Trempe G (1975): New human tumor cell lines. In: Human Tumor Cells *in vitro* (Fogh J edt.); Plenum Press, New York
30. Fong SFT, Mink M, Hinck A *et al.* (2000): Functional studies of LOXL2. A new putative tumor suppressor gene in humans and drosophila. *American Association for Cancer Research 91st annual meeting* **41**: 246
31. Frohman MA (1994): On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Meth Appl* **4**: 40-58
32. Gellner K, Praetzel G, Bosch TC (1992): Cloning and expression of a heat-inducible hsp70 gene in two species of Hydra which differ in their stress response. *Eur J Biochem* **210**: 683-91
33. Giampuzzi M, Botti G, Cilli M *et al.* (2001): Down-regulation of lysyl oxidase-induced tumorigenic transformation in NRK-49F cells characterizes by constitutive activation of ras-*proto-oncogene*. *J Biol Chem* **276**: 29226-32
34. Görögh T, Lippert BM, Gottschlich S *et al.* (1995): Etablierung und Charakterisierung zweier Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Mundbodens und der Zunge. *Laryngo-Rhino-Otol* **74**: 684-690
35. Göttlicher M, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1997): The AP-1 Family of Transcription Factors: Multi-Level Control of Activity. In: Transcription Factors in Eukaryotes; Papavassiliou AG (Edt.); Landes Biosciences/ Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
36. Hämläinen ER, Jones TA, Sheer D *et al.* (1991): Molecular cloning of human lysyl oxidase and assignments of the gene to chromosome 5q23.3-31.2. *Genomics* **11**: 508-516
37. Hardisson D (2003): Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [epub ahead of print]
38. He J, Tang HJ, Wang YY *et al.* (2002): Expression of lysyl oxidase gene in upper digestive tract carcinomas and its clinical significance. *Ai Zheng* **21**: 671-674
39. Hein S, Yamamoto SY, Okazaki K *et al.* (2001): Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta* **22**: 49-57
40. Hellman S, Vokes EE (1996): Fortschritte in der herkömmlichen Krebstherapie. In: Spektrum der Wissenschaften. Spezial: Krebsmedizin: 59-65

41. Henmi H, Endo T, Nagasawa K *et al.* (2001): Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod* **64**: 157-62
42. Hittelman WN (2001): Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer. *Annals of the New Yorker Academy of Sciences* **952**: 1-12
43. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF *et al.* (1998): The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**: 951-962
44. Hoffmann M (1998): Untersuchungen zum molekulargenetischen Nachweis humaner Papillomvirus-DNA-Sequenzen in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
45. Holstein M, Sibransky D, Vogelstein B *et al.* (1991): p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53
46. Holtmeier C, Görögh T, Beier U *et al.* (2003): Overexpression of a Novel Lysyl Oxidase-like Gene in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Research* **23**: 2585-2592
47. Jourdan-Le Saux C, Le Saux O, Donlon T *et al.* (1998): The human lysyl oxidase-related gene (LOXL2) maps between markers D8S280 and D8S278 on chromosome 8p21.2-21.3. *Genomics* **51**: 305-7
48. Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A *et al.* (2001): Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics* **74**: 211-8
49. Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L *et al.* (1999): The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem* **274**: 12939-44
50. Kagan HM, Trackman PC (1991): Properties and function of lysyl oxidase. *Am. J. Respir Cell Mol Biol* **5**: 206-210
51. Kagan HM, Reddy VB, Panchenko MV *et al.* (1995): Expression of lysyl oxidase from cDNA constructs in mammalian cells: the propeptide region is not essential to the folding and secretion of the functional enzyme. *J Cell Biochem* **59**: 329-38
52. Katan Y, Agami R, Shaul Y (1997): The transcriptional activation and repression domains of RFX1, a context-dependent regulator, can mutually neutralize their activities. *Nucleic Acids Res* **15**: 3621-8
53. Kenyon K, Modi WS, Contente S *et al.* (1993): A novel human cDNA with a predicted protein similar to lysyl oxidase maps to chromosome 15q24-q25. *J Biol Chem* **268**: 18435-7

54. Kim Y, Peyrol S, So CK *et al.* (1999): Coexpression of the lysyl oxidase-like gene (LOXL) and the gene encoding type III procollagen in induced liver fibrosis. *J Cell Biochem* **72**: 181-8
55. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF *et al.* (2002): A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* **62**: 4478-83
56. Koolmann J, Röhm K-H (1997): Taschenatlas der Biochemie. Thieme-Verlag, Stuttgart
57. Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg (2001): Gentherapie. www.krebsinformation.de/body_gentherapie.html
58. Latchman DS (1997): Regulation of the Gene Expression by POU Family Transcription Factors. In: Transcription Factors in Eukaryotes; Papavassiliou AG (Edt.); Landes Biosciences/ Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
59. Latif F, Fivash M, Glenn G (1992): Chromosome 3p deletions in Head and Neck Carcinomas: Statistical Ascertainment of Allelic Loss. *Cancer Res* **52**: 1451-1456
60. Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix-Trench G *et al.* (1991): Analysis of gene amplification in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Int J Cancer* **48**: 511-515
61. Liang P, Pardee AB (1992): Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science* **257**: 967-971
62. Li W, Nellaiappan K, Strassmaier T *et al.* (1997): Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12817-12822
63. Lund VJ, Howard DJ (1990): Head and Neck cancer in the young: a prognostic conundrum? *J Laryngo Oto* **104**: 544-548
64. Maaß J-D (1997): Untersuchungen zum Nachweis von p53-Proteinen und Serum p53-Antikörpern bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des oberen Kopf-Hals-Bereiches. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
65. Maestro R, Dolcetti R, Gasparotto D *et al.* (1992): High frequency of p53 gene alteration associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* **7**: 1159-1166
66. Maestro R, Gasparotto T, Vukosavljevic T (1993): Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res* **53**: 5775-5779
67. Mäki JM, Tikkanen H, Kivirikko KI (2001): Cloning and characterization of a fifth human lysyl-oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cystein-rich domains. *Matrix Biology* **20**: 493-96

68. Mäki JM, Kivirikko KI (2001): Cloning and chracterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J* **15**: 381-87
69. Mariani TJ, Trackman PC, Kagan HM *et al.* (1992): The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosome 5 (extensive sequence homology with the murine ras recision gene). *Matrix* **12**: 242-48
70. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC (1982): A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal Biochem* **121**: 382-87
71. Meredith SD, Levine PA, Burns JA *et al.* (1995): Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinomas. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* **121**: 790-794
72. Michalides RJ, van Veelen NM, Kristel PM (1997): Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg* **123**: 497-502
73. Molnar J, Fong KS, He QP *et al.* (2003): Structural and functional diversity of lysyl oxidase and LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* **11**: 220-224
74. Moore AE, Sabachewsky L, Toolan HW (1952): *Cancer Res* **15**: 598
75. Motokura T, Arnold A (1993): PRAD1/Cyclin D1 Proto-Oncogene. Genomic Organisation, 5'DNA Sequence, and Sequence of a Tumor-Specific Rearrangement Breakpoint. *Genes, Chromosomes and Cancer* **7**: 89-95
76. Mounts P, Shah K, Kashima H (1982): Viral etiology of juvenile- and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5425-5429
77. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S *et al.* (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engeneering* **10**: 1-6
78. Nielsen H, Krogh A (1998): Prediction of signal peptides and signal anchors by hidden Markov model. In Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6), AAAI Press, Menlo Park, California: 122-130
79. Old LJ (1996): Immuntherapie gegen Krebs: In: Spektrum der Wissenschaften. Spezial: Krebsmedizin
80. Oliff A, Gibbs J B, McCormick F (1996): Neue molekulare Angiffsziele für eine Krebstherapie. In: Spektrum der Wissenschaften. Spezial: Krebsmedizin
81. Peterson WD Jr, Stulberg CS, Simpson WF (1971): A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**: 1187-91

82. Peyrol S, Raccurt M, Gerard F *et al.* (1997): Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathol* **150**: 497-507
83. Pugh BF (1997): Dynamics of Transcription Complex Assembly. In: Transcription Factors in Eukaryotes; Papavassiliou AG (Edt.); Landes Biosciences/ Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
84. Rheinwald JG, Beckett MA (1981): Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas. *Cancer Res* **41**: 1657-1663
85. Rikimaru K, Tadokoro K, Yamamoto T *et al.* (1992): Gene amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the Head and Neck. *Head and Neck* **14**: 8-13
86. Robbins KT, Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery; University of Tennessee; Memphis, Tennessee (1988) : Advances in Head and Neck Oncology. Singular Publishing Group, San Diego, London
87. Rodrigo JP, Lazo PS, Ramos A *et al.* (1996): MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **122**: 504-507
88. Rossi A, Jang SI, Ceci R *et al.* (1998): Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **110**: 34-40
89. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS *et al.* (1998): Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr* **67**: 996-1002
90. Sahar E, Latt SA (1978): Enhancement of banding patterns in human metaphase chromosomes by energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5650-4
91. Saito H, Papaconstantinou J, Sato H *et al.* (1997): Regulation of a novel gene encoding a lysyl oxidase-related protein in cellular adhesion and senescence. *J Biol Chem* **28**: 8157-60
92. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
93. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT (1991): High frequency mutation in codons 12 and 16 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Cancer Res* **63**: 573-578
94. Saranath D, Panchal RG, Nair R *et al.* (1992): Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in Human Oropharyngeal Cancer. *Oral Onco Eur J Cancer* **28B**: 139-143

95. Schaefer BC (1995): Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* **227**: 255-273
96. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J *et al.* (1991): E-Cadherin Expression in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck: Inverse Correlation with Tumor Dedifferentiation and Lymph Node Metastasis. *Cancer Res* **51**: 6328-6337
97. Schirrmacher V (1986): Krebs und krebserzeugende Faktoren. In: Krebs – Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaft: Verständliche Forschung
98. Schlegelberger B, Metzke S, Harder S *et al.* (1999): Classical and Molecular Cytogenetics of Tumor Cells. In: Diagnostic Cytogenetics; Wegner R-D (Ed.); Springer Lab Manual; Springer-Verlag
99. Shuman S (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccina DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**: 32678-32684
100. Siegel RC, Pinnell SR, Martin GR (1970): Cross-linking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase. *Biochemistry* **9**: 4486-4492
101. Sisk EA, Robertson ES (2002): Clinical implications of human papillomavirus infection. *Front Biosci* **7**: 77-84
102. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME *et al.* (1991): Frequent p53 mutations in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* **52**: 5997-6000
103. Somers KD, Cartwright SL, Schechter GL (1990): Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* **5**: 915-920
104. Somers KD, Schechter GL (1992): Genetic alterations in Head and Neck cancer. *Otolaryngol Clin N Am* **25**: 1065-1071
105. Szabo Z, Light E, Boyd CD *et al.* (1997): The human lysyl oxidase-like gene maps between STS markers D158215 and GHLC.GCT7C09 on chromosome 15. *Human Genet* **101**: 198-200
106. Terhaard C, Hordijk G, van den Broek P *et al.* (1992): T3 laryngeal cancer: a retrospective study of the Dutch Head and Neck Oncology Group: study design and general results. *Clin Otolaryngol* **17**: 393-402
107. Tsutsumi M, Sakamoto H, Yoshida T *et al.* (1988): Coamplification of the hst-1 and int-2 genes in human cancers. *Jpn J Cancer Res* **79**: 428-432
108. Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J *et al.* (1992): Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* **267**: 8666-71

109. Trivedy C, Warnakulasuriya KA, Hzarey VK *et al.* (1999): The upregulation of lysyl oxidase in oral submucous fibrosis and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* **28**: 246-51
110. Ullmann A, Perrin D (1970): In: Beckwith J, Zipser D (Hrsg.): The Lactose operon. Cold Spring Harbor; 143-72
111. Varmus H, Weinberg RA (1992): Gene und Krebs – Biologische Wurzeln der Tumorentstehung. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford
112. Vogelstein B, Gillespie D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 615-19
113. Wakasaki H, Ooschima A (1990): Immunohistochemical localization of lysyl oxidase with monoclonal antibodies. *Lab Invest* **63**: 377-384
114. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) : Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* **55**: 1156-1158
115. Wang SX, Mure M, Medzihradsky KF *et al.* (1996): A crosslinked cofactor in lysyl oxidase: redox function for amino acid side chains. *Science* **273**: 1078-1084
116. Werner JA (1998): Aktueller Stand der Versorgung des Lymphabflusses maligner Kopf-Hals-Tumoren. *Eur Arch Otorhinolaryngol (Suppl.)*: 1-85
117. Westhofen M, Weber C, Grzyska U (2001): Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, systematisch. UNI-MED Verlag, Bremen
118. Worsham MJ, Van Dyke DL, Grenman SE *et al.* (1991): Consistent chromosome abnormalities in squamous cell carcinoma of the vulva. *Genes Chrom Cancer* **3**: 420-432
119. Worsham MJ, Carey TE, Benniger MS *et al.* (1993): Clonal cytogenetic evolution in a squamous cell carcinoma of the skin from a xeroderma pigmentosum patient. *Genes Chrom Cancer* **7**: 158-64
120. Xie RL, Gupta S, Miele A *et al.* (2003): The Tumor Suppressor Interferon Regulatory Factor 1 Interferes with SP1 Activation to Repress the Human CDK2 Promotor. *J Biol Chem* **278**: 26589-96
121. Yamada Y, Pannell R, Forster A *et al.* (2000) : The oncogenic LIM-only transcription factor Lmo2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 320-4
122. Yamada Y, Pannell R, Forster A *et al.* (2002) : The LIM domain protein Lmo2 is a key regulator of tumour angiogenesis : a new anti-angiogenesis drug target. *Oncogene* **21**: 1309-15

123. Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL *et al.* (1994): ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* **104**: 1337-1347
124. Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A *et al.* (1995): Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7416-7419
125. Zschocke J, Manthey D, Bayatti N *et al.* (2002): Estrogen receptor alpha-mediated silencing of calveolin gene expression in neuronal cells. *J Biol Chem* **277**: 38772-80

9 Anhang

9.1 Material

In den folgenden Tabellen sind alle Materialien, die für diese Arbeit verwendet wurden, unter Angabe des jeweiligen Herstellers aufgeführt. Soweit nicht anders erwähnt hatten alle Chemikalien molekularbiologische Reinheitsstufe oder Reinheitsgrad *pro analysi* (*p. a.*).

Tabelle 9.1.1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar Agar	Serva; Heidelberg, Germany
Agarose	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Amphotericin B (lyophilisiert; 1,25mg)	Biochrom AG; Berlin, Germany
Ampicillin	Grünenthal GmbH; Aachen, Germany
Aqua bidest.	Fresenius Kabi; Bad Homburg, Germany
ATP (Ribonucleotid)	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
[α - ³² P]dATP	Amersham Biosciences; Freiburg, Germany
Bacto-Trypton	BD Biosciences; Heidelberg, Germany
Bacto-Yeast	BD Biosciences; Heidelberg, Germany
Ba (OH) ₂	Merck; Darmstadt, Germany
Blockingsolution vial 6	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Borsäure	Merck; Darmstadt, Germany
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma; Steinheim, Germany
Bromphenol-Blau	Merck; Darmstadt, Germany
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck; Darmstadt, Germany
Chloroform	Merck; Darmstadt, Germany
CEP 10	Vysis; Downers Grove, USA
Chromomycin A3	Sigma; Steinheim, Germany
Colcemid	Ciba; Wehr, Germany
Coomassie Blue G-250	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Cot-1-DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Germany

CSPD, ready to use	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
CTP (Ribonucleotid)	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Cy3-conjugiertes Avidin	Jackson ; Freising, Germany
DABACO (1,4-Diazabicyclo-(2,2,2,-)octan)	Sigma ; München, Germany
Deionisiertes Formamid	Gibco/Life Technologies ; Karlsruhe, Germany
Dextranblau	Merck ; Darmstadt, Germany
Dextransulfat	Sigma; München, Germany
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma ; München, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck; Darmstadt, Germany
Dithiothreitol (DTT; 0,1M)	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
DNA Molecular Weight Marker V	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
dNTP-Mix (10mM each)	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
ETA (Titriplex III)	Merck; Darmstadt, Germany
Eisessig	Merck; Darmstadt, Germany
Ethanol absolut	Merck; Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Fetal Calf Serum (FCS) Gold	PAA; Linz, Austria
Ficoll	Pharmacia Biotech; Uppsala, Sweden
5xFirst-Strand Buffer	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Formaldehyd	Merck; Darmstadt, Germany
Formamid	Merck; Darmstadt, Germany
Giemsa	Merck; Darmstadt, Germany
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck; Darmstadt, Germany
Glycerol (ca. 87%)	Merck; Darmstadt, Germany
GTP (Ribonucleotid)	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Harnstoff (Urea)	Merck; Darmstadt, Germany
HEPES	Biochrom KG; Berlin, Germany
Kaliumchlorid (KCl)	Merck; Darmstadt, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck; Darmstadt, Germany
Kanamycin	Merck; Darmstadt, Germany
Lipofectin Reagent	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ; 25mM)	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck; Darmstadt, Germany
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck; Darmstadt, Germany
Maleinsäure	Merck; Darmstadt, Germany
MEM-Earle (w. NEA; w. L-Glutamin; w/o	Biochrom AG; Berlin, Germany

NaHCO ₃)	
Methanol	Merck; Darmstadt, Germany
Methylgrün	Sigma; München, Germany
MOPS	Merck; Darmstadt, Germany
Natriumacetat (NaAc)	Merck; Darmstadt, Germany
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Biochrom AG; Berlin, Germany
Natriumchlorid (NaCl)	Merck; Darmstadt, Germany
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck; Darmstadt, Germany
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck; Darmstadt, Germany
Natriumazid (NaN ₃)	Merck; Darmstadt, Germany
Natriumpyruvat (100mM)	Biochrom AG; Berlin, Germany
Nonidet-P40	Fluka Chemie; Buchs, Switzerland
Oligonucleotide (Primer)	MWG-Biotech; Ebersberg, Germany
Paraformaldehyd	Merck; Darmstadt, Germany
10xPCR-Puffer	Qiagen; Hilden, Germany
Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml)	Biochrom AG; Berlin, Germany
Phosphorsäure	Chem. Fabrik Budenheim KG; Budenheim, Germany
PMSF	Serva; Heidelberg, Germany
Polyvinylpyrrolidon	Sigma; München, Germany
2-Propanol	Merck; Darmstadt, Germany
Propidium-Iodid	Sigma; München, Germany
5xQ-Solution	Qiagen GmbH; Hilden, Germany
Ready-Load 100bp DNA Ladder	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Rifampicin	Sigma; München, Germany
Rotiphorese NF Acrylamid/Bis-Lösung	Roth; Karlsruhe, Germany
Saccharose	Walter; Kiel, Germany
Sephadex-G50	Amersham Pharmacia; Freiburg, Germany
Salmon-Sperm-DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	BD Clontech; Heidelberg, Germany
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	Serva; Heidelberg, Germany
TES	Sigma; München, Germany
TSR-Puffer	Applied Biosystems; Weiterstadt, Germany
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck; Darmstadt, Germany
Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck; Darmstadt, Germany
Trizol	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Trockenmilchpulver	Uelzena; Uelzen, Germany
Trypsin/EDTA-Lösung (10x; 5g Trypsin/2g EDTA)	Sigma; München, Germany
Tween-20	Merck; Darmstadt, Germany

[α - ³² P]UTP (Ribonucleotid)	Amersham Biosciences; Freiburg, Germany
dUTP spectrum green (SG)	Vysis; Downers Grove, USA
dUTP spectrum orange (SO)	Vysis; Downers Grove, USA
Zitronensäure	Merck; Darmstadt, Germany

Tabelle 9.1.2: Enzyme und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Bcl I	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Bgl II	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Dispace I	Roche Diagnostics; Mannheim, Germany
Hind III	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Klenow-Fragment	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Nco I	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Pepsin	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Superscript II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
T4 DNA Ligase	Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, Germany
Taq DNA Polymerase	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
Trypsin/EDTA-Lösung (10x; 5g Trypsin/2g EDTA)	Sigma; München, Germany

Tabelle 9.1.3: Kits

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems; Weiterstadt, Germany
Advantage 2 PCR Enzyme System	BD Clontech; Heidelberg, Germany
Bioprime DNA Labeling System	Life Technologies; Karlsruhe, Germany
Dual Luciferase Reporter Assay Kit	Promega; Mannheim, Germany
E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II	Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen, Germany
GFX Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Germany
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg, Germany
Perfectprep Plasmid Maxi Kit	Eppendorf; Köln, Germany
QIAexpress Kit (Type ATG 32169)	Qiagen; Hilden, Germany
SMART RACE cDNA Amplification Kit	BD Clontech; Heidelberg, Germany
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen; Karlsruhe, Germany

Tabelle 9.1.4: Plasmidvektoren

Bezeichnung	Hersteller
pCR-2.1 TOPO-Vector	Invitrogen; Karlsruhe, Germany
pGL3-Enhancer-Vector	Promega; Mannheim, Germany
pRL-TK-Vector	Promega; Mannheim, Germany

Tabelle 9.1.5: Nähr- und Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Dissoziationsmedium	3,6mM KCl, 8mM CaCl ₂ , 1,2mM MgSO ₄ , 6mM <i>tri</i> -Natriumcitratdihydrat, 6mM Natriumpyruvat, 6mM Glucose, 12,5mM TES, 50µg/ml Rifampicin, 0,5% Nonidet-P40 in Aqua dest. lösen, sterilfiltrieren.
Dubecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	9,7g MEM-Earle, 4,75g HEPES, 0,75g NaHCO ₃ , 20.000U Penicillin/Streptomycin in Aqua dest. ad 900ml lösen; pH 7,3 einstellen; sterilfiltrieren; anschließend Zugabe von 100ml FCS (steril, hitzeinaktiviert für 30min bei 56°C) und 2,5mg Amphotericin B (in 10ml DMEM gelöst, sterilfiltriert).
KBM (Keratinocytenmedium)	gebrauchsfertig: Cambrex Bio Science Verviers, S.p.r.l.; Apen, Germany.
KGM (Zusätze für KBM)	Cambrex Bio Science Verviers, S.p.r.l.; Apen, Germany.
LB-Agarplatten	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast, 5g NaCl in Aqua dest. ad 1l lösen; pH 7,0 einstellen; 15g Agar Agar zugeben; autoklavieren; nach Abkühlung auf 55°C 100µg/ml Ampicillin zugeben und noch über 50°C warm in Petrischalen gießen.
LB-Medium	10g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Yeast, 5g NaCl in Aqua dest. ad 1l lösen; pH 7,0 einstellen; autoklavieren; nach Abkühlung auf mind. 55°C 100µg/ml Ampicillin zugeben.
SOC-Medium	2% Trypton, 0,5% Yeast Extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM Glucose in Aqua dest.; pH 7,0.
Transportmedium	8000U Penicillin/Streptomycin, 250µg Amphotericin B in 100ml DMEM.

Tabelle 9.1.6: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antifade-Lösung	90ml Glycerol, 10ml PN-Puffer incl. 23mg/ml DABACO.
Ba(OH) ₂ -Lösung	5g Ba(OH) ₂ in 100ml Aqua dest. lösen.
5x Binding Buffer	50mM Tris-HCl (pH 8,0), 750mM KCl, 2,5mM EDTA, 0,5% Triton-X 100 (v/v), 62,5% Glycerol (v/v), 1mM DTT in Aqua dest.
Blocking-Lösung	5ml Blockingsolution vail 6 (Roche), 45ml Maleinsäurepuffer.
BRADFORD-Reagenz	0,01% Coomassie Blue G-250, 4,7% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure in Aqua dest.
Carnoy's Fixativ	Methanol : Essigsäure= 3:1.
Chromomycin-A3-Lösung	0,5mg/ml Chromomycin A3, 70mM KH ₂ PO ₄ , 70mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5mM MgCl ₂ in Aqua dest. lösen.
DD-Ladepuffer	97% Formamid, 10mM EDTA, 0,1% (w/v) Bromphenolblau in Aqua dest. lösen.
DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC in Aqua dest; über Nacht stehen lassen und am Folgetag autoklavieren.
Digestionslösung	5mg Pepsin, 1ml 1N HCl in 99ml Aqua bidest. lösen.
6xDNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 40% (w/v) Sucrose in Aqua dest.
EDTA	186,12g ETA (Titriplex III) in 1l Aqua dest. lösen; pH 8,0 mit Essigsäure einstellen.
High Salt Buffer	10ml 100mM HEPES (pH 7,9), 75µl 1M MgCl ₂ , 16ml 2,5M KCl, 20µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 15,75g Glycerol, 5ml 10%iges Nonidet NP-40, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF in Aqua dest ad 50ml lösen.
Low Salt Buffer	10ml 100mM HEPES (pH 7,9), 75µl 1M MgCl ₂ , 0,4ml 2,5M KCl, 20µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 15,75g Glycerol, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF in Aqua dest. ad 50ml lösen.
Maleinsäurepuffer	100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, in Aqua dest.; pH 7,5 einstellen.
McIlvane's Puffer (pH 4,0)	61,45ml 0,1M Zitronensäure, 38,55ml 0,2M Na ₂ HPO ₄ .

Mcllvane`s Puffer (pH 6,0)	3,33ml 0,1M Zitronensäure, 6,67ml 0,2M Na_2HPO_4 .
Methylgrün-Stammlösung	1,75g Methylgrün in 100ml Mcllvane`s Puffer (pH 4,0).
Methylgrün-Gebrauchslösung	200µl Methylgrün-Stammlösung in 10ml Mcllvane`s Puffer (pH 6,0).
10xMOPS	200mM MOPS, 50mM NaOAc, 10mM EDTA in Aqua dest.; pH 7,0 einstellen.
PBS-Gebrauchslösung	10% PBS-Stammlösung in Aqua dest.; autoklavieren.
PBS-Stammlösung (10x)	80g NaCl, 2g KCl, 11,5g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2g KH_2PO_4 in Aqua dest ad 1l lösen.
PN-Puffer	0,1M NaH_2PO_4 , 0,1M Na_2HPO_4 in Aqua dest.; pH 8,0 einstellen.
PNM-Puffer	5% Trockenmilchpulver in PN-Puffer; über Nacht bei 50°C rühren; 0,03% NaN_3 zufügen.
Puffer 3	100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl_2 in Aqua dest.; pH 9,5 einstellen.
5xRNA-Ladepuffer	16µl gesättigte Bromphenolblaulösung, 80µl 500mM EDTA, 100µl Ethidiumbromid (10mg/ml), 720µl 37%iges Formaldehyd, 2ml 100%iges Glycerol, 3084µl Formamid, 4ml 10xMOPS.
20xSSC	175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat in Aqua dest.; pH 7,0.
30% STARKS	30% Formamid, 0,02% BSA (w/v), 0,02% Ficoll (w/v), Polyvinylpyrrolidon (w/v), 5x SSC, 1% SDS in Aqua dest.
Sucrose Buffer	5,47g Saccharose, 0,5ml 1M Tris-Base (pH 8,0), 150µl 1M CaCl_2 , 100µl 1M MgOAc , 10µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 0,5mM PMSF, 1mM DTT in Aqua dest. ad 50ml.
Sucrose Buffer incl. Nonidet NP-40	wie Sucrose Buffer incl. 2,5ml 10%iges Nonidet NP-40.
50xTAE-Puffer	242g Tris-Base, 57,2ml Eisessig, 100ml 0,5M EDTA (pH 8,0) in Aqua dest. ad 1l.
TBE-Puffer	90mM Tris-HCl, 90mM Borsäure, 2mM EDTA in Aqua dest.
0,5xWaschlösung	0,1% SDS in 0,5xSSC.
2xWaschlösung	0,1% SDS, in 2xSSC.

Waschpuffer	100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, 0,3% Tween-20 in Aqua dest.; pH 7,5 einstellen.
-------------	--

Tabelle 9.1.6: Laborgeräte und Laborzubehör

Bezeichnung	Hersteller
Automatischer Sequenzierer (ABIPrism TM 310 Genetic Analyser)	Perkin Elmer; Norwalk, USA
Autoklav (2540)	Tuttnauer; Breda, Netherlands
Brutschrank (Nuaire)	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Crosslinker (UV Stratalinker 1800)	Stratagene; La Jolla, CA, USA
Cryotubes (2ml)	Greiner Labortechnik; Frickenhausen, Germany
Deckgläschen (rund; Ø 10mm)	Menzel-Gläser; Braunschweig, Germany
Durchlichtmikroskop (Axioplan)	Zeiss; Göttingen, Germany
Elektrophoresekammer (Horizon 11•14, Horizontal Gel Electrophoresis System)	Life Technologies; Gaithersburg, USA
Elektrophoresekammer (Multigel)	Biometra; Göttingen, Germany
Elektrophoresekammer (Two Step Direct Blotter)	Hoefer; San Francisco, USA
Entwicklermaschine (RP X-OMAT Processor, Model M7B)	Kodak; Stuttgart, Germany
Eppendorfpipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf; Köln, Germany
Filterpapier	Whatman; Maidstone, UK
Fixogum	Marabu; Tamm, Germany
Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot)	Zeiss; Göttingen, Germany
Geltrockner (GD40/50 D)	Life Technologies; Gaithersburg, MD, USA
Hybridisierungssofen (OV 5)	Biometra; Göttingen, Germany
Inversionsmikroskop (IMT-2)	Olympus Microscopy; Hamburg, Germany
Kettendeckeltubes (0,2ml)	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Luminometer (Lumat LB 9507)	Berthold Technologies; Bad Wildbad, Germany
Luminometerröhrchen	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Magnetrührer	NeoLab; Heidelberg, Germany
Microwelle	Samsung; Schwalbach/Ts., Germany
Netzgerät (Electrophoresis Power Supply-EPS 3500)	Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, England
Nylonmembran (Hybond-N+)	Amersham Pharmacia Biotech; Buckinghamshire, England
pH-Sonde (InoLab, pH Level 1)	WTW; Weilheim, Germany
Pinzetten	Walter; Kiel, Germany

Röntgenfilme (T-MAT Plus DG Film)	Kodak; Stuttgart, Germany
Röntgenfilme (Biomax MR-Film)	Kodak; Stuttgart, Germany
Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolien (Kodak X-Omatic)	Kodak; Stuttgart, Germany
Skalpelle (zum Einmalgebrauch, steril; No. 10)	pfm; Köln, Germany
Spectrophotometer (Uvikon 931)	Kontron Instruments; Herts, UK
Spritzen (steril; 1, 2, 5, 10, 20ml)	BD Biosciences; Heidelberg, Germany
Spritzenfilter (Porengröße 0,2µm)	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Spritzenfilter (Porengröße 1,2µm)	Sartorius; Göttingen, Germany
Spritzennadeln (0,8x40mm)	BD Biosciences; Heidelberg, Germany
Sterilbank (8511)	Köttermann; Uetze/Hänigsen, Germany
Sterilfilter (Cellulose-Acetat-Filter; Porengröße 0,2µm)	Sartorius; Göttingen, Germany
Sterilfiltersystem (SM 16 510)	Sartorius; Göttingen, Germany
Suprasil Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma; Mühlheim, Germany
Thermocycler (DNA Thermal Cycler 480)	Perkin Elmer; Norwalk, USA
Thermocycler (GeneAmp PCR System 9600)	Perkin Elmer; Norwalk, USA
Thermocycler (T3)	Biometra; Göttingen, Germany
Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt ; Nümbrecht, Germany
Ultraschallsonde (UP 200H)	Dr. Hielscher GmbH; Teltow, Germany
UV-Spektrometer (BioDoc II)	Biometra; Göttingen, Germany
Vakuumblotter	Oncor; Gaithersburg, MD, USA
Vakuumzentrifuge (Speed Vac SC 110)	Savant; New York, USA
Wasserbad (1083)	GFL; Burgwedel, Germany
Wasserbad (SW-20C)	Julabo; Hamburg, Germany
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ²)	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Zellkulturplatten (Falcon, 6-Well)	BD Biosciences; Heidelberg, Germany
Zellschaber	Sarstedt; Nümbrecht, Germany
Zentrifuge (Centrifuge 5417 R)	Eppendorf; Köln, Germany
Zentrifuge (Centrifuge 5804 R)	Eppendorf ; Köln, Germany
Zentrifugenröhrchen (Falcon , 15ml, 50ml)	BD Biosciences; Heidelberg, Germany

9.2 LOXL4-mRNA-Expression in Zelllinien und Biopsate

In der folgenden Tabelle sind alle untersuchten HNSCC-Zelllinien, -Biopsate, benigne Biopsate sowie gesunde epitheliale Schleimhautzellen aufgeführt, in denen die LOXL4-mRNA-Expression mittels Northern Hybridisierung vergleichend untersucht wurde (siehe „Ergebnisse“ 4.6). Neben der Herkunft der Tumorzellen und -Biopsate sind ferner die Art der Tumore (Primärtumor oder Metastase) und die TNM-Stadien aufgeführt. Eine Angabe derjenigen Wissenschaftler, die die Tumorzelllinien etabliert haben, befindet sich in der Legende der Tabelle. Für alle Zellen und Biopsate ist die ermittelte LOXL4-mRNA-Expression angezeigt.

Tabelle 9.2.1: LOXL4-mRNA-Expression in verschiedenen Zelltypen des oberen Aerodigestivtraktes

Nr.	Bezeichnung	Zell- bzw. Gewebetyp	Art des Tumors	T*	N*	M*	LOXL4-mRNA-Expression
1	UTSCC19A	Larynxkarzinom	Primär	4	0	0	+++
2	HTB117	Pharynxkarzinom	Primär	-	-	-	+++
3	UTSCC9	Larynxkarzinom	Metastase	2	0	0	++
4	UMSCC5a	Larynxkarzinom	Primär	2	1	0	+
5	UMSCC11b	Larynxkarzinom	Primär	2	1	0	+
6	UMSCC22b	Hypopharynxkarzinom	Primär	2	1	0	---
7	HLac 78	Larynxkarzinom	Metastase	2	2	0	++
8	CCL138	Pharynxkarzinom	Primär	-	-	-	++
9	CCL23	Larynxkarzinom	Primär	-	-	-	++
10	CRL1623	Zungenkarzinom	Primär	-	-	-	++
11	HTB43	Pharynxkarzinom	Primär	-	-	-	+
12	CRL1624	Zungenkarzinom	Primär	-	-	-	+
13	CRL1628	Zungenkarzinom	Primär	-	-	-	---
14	HCFMK1	Mundbodenkarzinom	Primär	4	3	0	---
15	UMSCC10	Larynxkarzinom	Primär	3	1	0	++
16		Stimmrinne	Primär	2	0	0	++
17		Larynx	Primär	4	0	0	+++
18		Oropharynx	Primär	4	1	0	++
19		Nasennebenhöhle	Primär	4	2	-	+++
20		Zungenrund	Primär	4	2	0	+++
21		Zungenrund	Primär	3	1	0	++
22		Parotis	Primär	-	-	-	++
23		Hypopharynx	Primär	3	2	0	+
24		Hypopharynx	Primär	4	3	0	+
25		Larynx	Primär	2	0	0	---
26		Larynx	Primär	3	0	0	+++
27		Parotis	Primär	-	-	-	++
28		Parotis	Primär	-	-	-	++
29		Hypopharynx	Primär	3	2	0	++
30		Larynx	Primär	-	-	-	---
31		Larynx	Metastase	-	-	-	+++

32	Zungengrund	Primär	3	1	0	+++
33	Zungengrund	Primär	-	-	-	---
34	Zungengrund	Primär	3	1	0	---
35	Zungengrund	Primär	3	2	1	---
36	Schilddrüse	Metastase	-	-	-	+
37	Parotis	Primär	-	-	-	---
38	Parotis	Primär	1	0	0	+++
39	Hypopharynx	Primär	2	2	0	+++
40	Larynx	Primär	2	2	0	---
41	Larynx	Primär	4	2	0	+++
42	Larynx	Primär	-	-	-	+++
43	Larynx	Primär	4	1	0	+++
44	Hypopharynx	Primär	4	2	0	+
45	Larynx	Primär	-	-	-	---
46	Larynx	Primär	3	0	0	---
47	Hypopharynx	Primär	-	-	-	---
48	Hypopharynx	Primär	4	2	0	---
49	Oropharynx	Primär	-	-	-	+++
50	Oropharynx	Primär	2	2	0	+++
51	Larynx	Primär	4	0	0	+++
52	Larynx	Primär	3	2	0	+++
53	Larynx	Primär	-	-	-	+
54	Larynx	Primär	-	-	-	++
55	Larynx	Primär	-	-	-	---
56	Larynx	Primär	2	2	0	---
57	Larynx	Primär	2	0	0	---
58	Larynx	Primär	4	2	-	---
59	Larynx	Primär	2	0	0	---
60	Larynx	Primär	2	0	0	++
61	Larynx	Primär	4	0	0	++
62	Larynx	Primär	-	-	-	---
63	Larynx	Primär	3	0	0	+
64	Larynx	Primär	4	1	0	++
65	Larynx	Primär	4	2	-	+++
66	Hypopharynx	Primär	4	2	0	+++
67	Hypopharynx	Primär	-	-	-	+
68	Hypopharynx	Primär	2	2	0	++
69	Hypopharynx	Primär	4	2	0	++
70	Hypopharynx	Primär	4	3	0	+
<hr/>						
71	Larynxpapillom	Primär	-	-	-	---
72-82	Pleomorphes Adenom	Primär	-	-	-	---
83-89	Pleomorphes Adenom	Primär	-	-	-	+
90-95	Pleomorphes Adenom	Primär	-	-	-	++
96-97	Pleomorphes Adenom	Primär	-	-	-	+++
98-100	Hämangiom	Primär	-	-	-	---
<hr/>						
101-111	gesunde epitheliale Schleimhautzellen	-	-	-	-	---
112-113	gesunde epitheliale Schleimhautzellen	-	-	-	-	+

1-15: Gut etablierte HNSCC-Zelllinien: 1, 3: ELOMAA *et al.* (1995); 2, 11: FOGH *et al.* (1975); 4: KRAUSE *et al.* (1981); 5, 6, 15: CAREY *et al.* (1983); 7: ZENNER *et al.* (1979); 8: PETERSON *et al.* (1971); 9: MOORE *et al.* (1952); 10, 12, 13: RHEINWALD *et al.* (1981); 14: GÖRÖGH *et al.* (1995)
 16-70: HNSCC-Biopsate; 71-100: Biopsate benignen Tumore des Kopf-Hals-Bereichs; 101-113: Kulturen gesunder epithelialer Schleimhautzellen des oberen Arodigestivtraktes.

9.3 PCR-Produkte, Primersequenzen und PCR-Parameter

Die folgende Tabelle beinhaltet alle in dieser Arbeit generierten PCR-Produkte, sowie die Sequenzen der dafür verwendeten Primer. Da alle Amplifikationen wie bereits im Kapitel „Methoden“ beschrieben mit den gleichen Grundparametern durchgeführt wurden und lediglich Unterschiede bezüglich des Annealing-Steps (Annealing-Temperatur und –Zeit) und der Anzahl der Zyklen bestanden, sind diese beiden Parameter entsprechend für jedes PCR-Produkt in der Tabelle aufgeführt.

Tabelle 9.3.1: PCR-Produkte, Primersequenzen und PCR-Parameter

Nr.	Bezeichnung des PCR-Produktes	Größe (bp)	Primersequenz [5'→3']: fw: forward-Primer rv: reverse-Primer	Annealing-Step im PCR-Zyklus	Zyklenzahl
1	LOXL4-Exon1	320	fw: CTCAGCTGTCCTTGAAGTCACCA rv: CTAGGTGGCACCAGTCACTCAC	62°C, 1min 30sec	35
2	LOXL4-Exon2	219	fw: CATCACCTCCACTCCACAGGAC rv: AGAGCCTGAACAGCCTCCTCAC	62°C, 1min 30sec	35
3	LOXL4-Exon3	274	fw: AGATCTGCAGGCTCCACTG rv: CCTGTAGTAGTGGCTGTGCGACA	60°C, 1min 30sec	35
4	LOXL4-Exon4	313	fw: GTCAGGGCTGCTGTGAAGCTCA rv: CTTCAGGACTAAGGGAGGCCAAG	60°C, 1min 30sec	35
5	LOXL4-Exon5	405	fw: CTTGGCCTCCCTTAGTCCTGAAG rv: CTCCCAGTCTGGTTCCTCTCTC	55°C, 1min 30sec	35
6	LOXL4-Exon6	222	fw: TGAAGCAGGTTTCTCCCAGCAG rv: CAGGCTGTCTCACTCACCTTG	62°C, 1min 30sec	35
7	LOXL4-Exon7	214	fw: GTTACGGAGATGGAGCCTCGCA rv: AGACCCAAACTCACCTGATTCTG	60°C, 1min 30sec	35
8	LOXL4-Exon8	265	fw: GAGCTCTTCCCTGCAAGGCTAC rv: CAGGAGGGTGAGAGGTCATACG	62°C, 1min 30sec	35
9	LOXL4-Exon9	192	fw: GTGACGCTGGCTGTCTTCTTAG rv: TCACTCACTGTCCATGCAGGAG	62°C, 1min 30sec	35
10	LOXL4-Exon10	243	fw: GCACCAGACCTGGTGATGAACG rv: ACCTGTGGCACTGGTGCCAAAC	60°C, 1min 30sec	35
11	LOXL4-Exon11	133	fw: GGCATTACCACAGCATTGAGGTC rv: GACAGGAAACCACATACCTGTGG	58°C, 1min 30sec	35

12	LOXL4-Exon12	202	fw: CTGTCTGTCCCCTTCCTTACAG rv: CTGGAGGAAATCAGGCTCTGTG	60°C, 1min 30sec	35
13	LOXL4-Exon13	119	fw: GGTGATTGTGAACCCCCACTATG rv: GAGTTACCTGTGTGGCAGTTGTG	58°C, 1min 30sec	35
14	LOXL4-Exon14	126	fw: CACAGGGAATTCATACCCAGCCA rv: AGCTGAGGTATCTGGTGTATCGG	59°C, 1min 30sec	35
15	LOXL4-Intr.1	528	fw: CACAGTGCCAAGTACGGCCAAG rv: CACACAGCGCACATTGTCCAGC	60°C, 1min 30sec	35
16	LOXL4-Intr.2	981	fw: GAAACTGTCTCCAATGCCCTTGG rv: ACTGGCAAGGATGGGCTTGAGC	64°C, 1min 30sec	35
17	LOXL4-Intr.3	1559	fw: GCCTGTCGACAGCCACTACTACA rv: CTTAGGGTCCCTCATCTTCAGATC	64°C, 1min 30sec	35
18	LOXL4-Intr.4	220	fw: GATCTGAAGATGAGGGACCCTAAG rv: AAGGAGTTCTTATTCGTCAGGCTC	64°C, 1min 30sec	35
19	LOXL4-Intr.5	955	fw: CACCGAAGACAAAGCCACAACGC rv: TGGCGGTTTCATGAGCACTTCCAC	64°C, 1min 30sec	35
20	LOXL4-Intr.6	366	fw: CCTCATCTCTGCCAGTGTCTGTG rv: CATTCTCATGTTGGCAACCATTCTG	62°C, 1min 30sec	35
21	LOXL4-Intr.7	785	fw: CTAACATGGGCTTTCAGAATCAGG rv: TCACCTCCACCTGCACCTCCAA	62°C, 1min 30sec	35
22	LOXL4-Intr.8	1118	fw: GTTTTGCCATCCATGCCTACAAGG rv: ACCCCACTCATCACCACTCCTG	62°C, 1min 30sec	35
23	LOXL4-Intr.9.1	938	fw: TTCCTGGCTGGAGTCTCCTGCA rv: GACTGCAGATTGGCTGACTGTGC	63°C, 1min 30sec	35
24	LOXL4-Intr.9.2	936	fw: GCACAGTCAGCCAATCTGCAGTC rv: GTGGGCACAATACAGCTGGCTG	63°C, 1min 30sec	35
25	LOXL4-Intr.10	1187	fw: CGTCCAAAGACTGGACGCGATAG rv: GAGCCATTGAGAGTGAGGAGGTC	62°C, 1min 30sec	35
26	LOXL4-Intr.11	738	fw: GACCTCCTCACTCTCAATGGCTC rv: GCCTACAGTCACTCCCTGTTCTC	62°C, 1min 30sec	35
27	LOXL4-Intr.12	474	fw: CCAGTGGGTGGATATCACAGATG rv: CTGACTCTGCCACTTCATAGTGG	62°C, 1min 30sec	35
28	LOXL4-Intr.13.1	1321	fw: CCACTATGAAGTGGCAGAGTCAG rv: CAGCACAATCTACTCAGCCACAC	62°C, 1min 30sec	35
29	LOXL4-Intr.13.2	910	fw: GTGTGGCTGAGTAGATTGTGCTG rv: GCTCCAGGGAGAGTTCTGCATTG	63°C, 1min 30sec	35
30	LOXL4-Prom.1	334	fw: CAGATGAGGAGACTGAGACTCAG rv: GCAGCAGCAGGAACAGAAAGAGG	60°C, 1min 30sec	35
31	LOXL4-Prom.2	272	fw: GTGCTAGGAACATCAGAAGGTGG rv: CTGAGTCTCAGTCTCCTCATCTG	60°C, 1min 30sec	35

32	LOXL4-Prom.3	277	fw: GTTGCAGTGAGCTGAGATTGCAG rv: CCACCTTCTGATGTTCCCTAGCAC	60°C, 1min 30sec	35
33	LOXL4-Prom.4	1060	fw: GGCAGGTCTCATCAGAACGAGC rv: CTGCAATCTCAGCTCACTGCAAC	60°C, 1min 30sec	35
34	LOXL4-Prom.5	1127	fw: GGAGAGCTGCAGAGGTGAGAATG rv: GCTCGTTCTGATGAGACCTGCC	60°C, 1min 30sec	35
35	LOXL4-REP1-2	77	fw: GCGAGATCTAGGTGTATAAGAG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	60°C, 1min 30sec	35
36	LOXL4-REP1-3	92	fw: GCGAGATCTTACACATAAGATTTTA rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	58°C, 1min 30sec	35
37	LOXL4-REP1-4	121	fw: GCGAGATCTGACTCAAATGGTG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	58°C, 1min 30sec	35
38	LOXL4-REP1-5	162	fw: GCGAGATCTTAGATAGTCTTGAC rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	58°C, 1min 30sec	35
39	LOXL4-REP1-6	214	fw: GCGAGATCTCATTTGATTAGGGTG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	62°C, 1min 30sec	35
40	LOXL4-REP1-7	255	fw: GCGAGATCTCAGCCTTCCATG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	60°C, 1min 30sec	35
41	LOXL4-REP1-8	306	fw: GCGAGATCTAGCCAATGAGTG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	58°C, 1min 30sec	35
42	LOXL4-REP1-10	457	fw: GTTGCAGTGAGCTGAGATTGCAG rv: CCGAAGCTTGTGCTTAGCAAAG	60°C, 1min 30sec	35
43	LOXL4-Sonde (=FIS-Sonde)	639	fw: TCACAACTGGCAGAGAAGC rv: TATTCCACTTGAGCAAGAGC	58°C, 1min 30sec	30
44	GAPDH	360	fw: CCAGCCGAGCCACATCGC rv: ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT	58°C, 1min 30sec	30

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Claudia Holtmeier
Geburtsdatum:	17.07.1975
Geburtsort:	Lingen, Deutschland
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Derzeitige Anschrift:	Waitzstr. 13, 24105 Kiel

Schulbildung

1982 - 1986	Kirchschule (Grundschule), Schüttorf
1986 - 1989	Dionysianum (Gymnasium), Rheine
1989 - 1995	Thomas-Mann-Schule (Gymnasium), Lübeck
Juni 1995	Abitur an der Thomas-Mann-Schule, Lübeck

Weiterer Bildungsweg

Oktober 1995 - August 2000	Biologiestudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Oktober 1997	Biologie-Vordiplom (Zoologie, Botanik, Chemie, Mathematik)
August 2000	Biologie-Diplom (Zoologie, Mikrobiologie, Biochemie)
August 1999 - August 2000	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe für Parasitologie am Zoologisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Priv. Doz. Dr. Wolfgang Böckeler): Thema: „ <i>Vorkommen und ausgewählte experimentelle Untersuchungen zur Verbreitung von parasitischen Protozoen bei Zootieren</i> “
Oktober 2000- Oktober 2003	Promotion an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Prof. Dr. Steffen Maune, Dr. Tibor Görögh; offizielle Betreuung durch Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch des Zoologischen Instituts der CAU Kiel): Thema: „ <i>Identifizierung, Charakterisierung und Regulation des LOXL4-Gens in Plattenepithelkarzinomzellen und –Biopsaten des oberen Aerodigestivtraktes</i> “

11 Erklärung und Publikationsliste

Hiermit erkläre ich, daß diese Dissertation – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder im Ganzen noch zum Teil an anderer Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegen. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits publiziert (siehe unten).

Kiel, (Claudia Holtmeier)

Publikationen

Paper

Gottschlich S, Koch R, Görögh T, Holtmeier C, Hoffmann M, Rudert H, Maune S (2002)

Collagenase 3 mRNA expression in squamous epithelial carcinomas of the oropharynx.

HNO 50: 43-47

Beier U, Görögh T, Holtmeier C, Ambrosch P, Maune S (2002)

Overexpression of the human Myosin-binding Protein-C1 mRNA in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Cells.

Anticancer Research 22: 3343-3348

Holtmeier C, Görögh T, Beier U, Meyer J, Hoffmann M, Gottschlich S, Heidorn K, Ambrosch P, Maune S (2003)

Overexpression of a Novel Lysyl Oxidase-like Gene in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.

Anticancer Research 23: 2585-2592

Görögh T, Werner JA, Lippert B, Gottschlich S, Hoffmann M, Rudert H, Song X, Holtmeier C, Meyer J, Maune S (2003)

Assessment of Beta2 Transferrin in Cerebrospinal Fluid: A Comparative Analysis of Different Body Fluids and Secretions.
Clinical Chemistry [accepted]

Kongress-Abstracts

Görögh T, Gottschlich S, Hoffmann M, Holtmeier C, Maaß J, Meyer JE, Maune S (2001)

Analyse der Genexpression in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes.
20. Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Berlin 9.-13.5.2001; Allergy 2001 Suppl. 68, 135
Poster

Görögh T, Holtmeier C, Gottschlich S, Maune S (2001)

Expression und molekulare Charakterisierung eines neuen Gens der Lysyl-Oxidase-Genfamilie in Plattenepithelkarzinomzellen aus Larynx.
Deutsch Österreichischer HNO-Kongress 2002; 72. Jahresversammlung Baden-Baden 8.-12.5.2002
Poster

Buchbeitrag

Görögh T, Gottschlich S, Hoffmann M, Holtmeier C, Hu S, Meyer JE, Naumann S, Maaß J, Rudert H, Maune S (2001)

What do head and neck carcinomas have in common with adenoids on the level of gene expression?

Proceedings of the 2nd International Symposium on Metastases in Head and Neck Cancer; Marburg 25.-27.01.2001: 67-61

Tectum Verlag 2001, ISBN 3-8288-8254-4

12 Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Onkologie“ der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der CAU Kiel bedanken:

Ich danke Prof. Dr. Petra Ambrosch und Prof. Dr. Steffen Maune für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Tibor Görögh für die engagierte Betreuung bedanken, durch die er das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht hat. Die täglichen wissenschaftlichen und manchmal auch unwissenschaftlichen Gespräche in ungezwungener Arbeitsatmosphäre haben mir viel Freude bereitet und mich sehr viel gelehrt. Danke, Tibor!

Mein Dank gilt auch meinen Labor-Kolleg(inn)en Anne-Marie Röen, Karin Klose, Heilwig Janßen und Ulf Beier für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft und für ihre unverzichtbare Hilfe, immer wenn Not am Mann war. Ferner bedanke ich mich bei den Damen vom Fotolabor, Siegrid Runge, Grytta Ohlsen und Margit Schneider, für ihre Arbeiten sowie auch bei allen übrigen Kolleginnen unseres Klinik-Flurs für die netten Lachsbrötchen-Geburtstagsfrühstücke.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Thomas C. G. Bosch des Zoologischen Instituts der CAU Kiel für die offizielle Betreuung dieser Arbeit, sein Interesse an dem Thema und seine hilfreichen Tipps.

Vielen Dank an Dr. Klaus Heidorn und Dr. Mark Polmann vom Institut für Hämatopathologie für die zahlreichen Sequenzierungen und die fachliche Unterstützung.

Ich danke ferner Dr. Svetlana Harder, Dr. Stefan Gesk und Dr. Rainer Siebert vom Institut für Humangenetik der CAU Kiel für ihre Hilfe bei der klassischen Chromosomenanalyse und FISH.

Vielen lieben Dank an meine Freunde, die mich besonders in der stressigen Zeit mit Spieleabenden oder leckerem Essen mal auf andere Gedanken gebracht haben.

Ganz besonders danke ich meinem Freund Andreas Till für seine enorme Geduld und Unterstützung, für seine ermutigenden, lieben Worte und seine kleinen Motivationsgeschenke. Wenn ich Dich nicht hätte...

Mein größter Dank gilt meinen lieben Eltern, die mich stets durch aufbauende Telefonate und Finanzspritzen unterstützt haben. Vielen, lieben Dank!

